



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE  
GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,  
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**TESIS DOCTORAL**

**DETECCIÓN DE COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS  
EN TORTUGAS MARINAS VARADAS EN LAS ISLAS  
CANARIAS Y CAUSAS DE MORTALIDAD**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: CLÍNICA Y TERAPÉUTICA**

Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup>. Patricia Monagas Manzano

Dirigida por Dr. Jorge Orós Montón, Dr. Óscar González Díaz y Dr. Javier Araña Mesa

**Directores de Tesis**

**Doctoranda**

Las Palmas de Gran Canaria, Abril del 2007





## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
<b>2.1. Principales patologías descritas en tortugas marinas</b> .....	15
2.1.1. Problemas nutricionales y metabólicos .....	15
2.1.2. Enfermedades bacterianas .....	16
2.1.2.1. Estomatitis ulcerativa - rinitis obstructiva – bronconeumonía....	16
2.1.2.2. Micobacteriosis .....	16
2.1.2.3. Infecciones dérmicas bacterianas .....	17
2.1.2.4. Encefalitis bacterianas .....	17
2.1.2.5. Clamidiasis .....	17
2.1.3. Enfermedades micóticas .....	17
2.1.3.1. Micosis superficiales.....	17
2.1.3.2. Micosis sistémicas .....	18
2.1.4. Enfermedades víricas.....	18
2.1.4.2. Enfermedad respiratoria por herpesvirus .....	19
2.1.4.3. Gray-patch disease.....	19
2.1.5. Fibropapilomatosis .....	20
2.1.6. Enfermedades parasitarias.....	21



2.1.6.2.	Endoparásitos protozoos.....	21
2.1.6.3.	Endoparásitos helmintos.....	22
2.1.7.	Patología medioambiental derivada de actividades humanas.	23
2.1.7.2.	Enmallamientos.....	23
2.1.7.3.	Pesca accidental.....	23
2.1.7.4.	Traumatismos por embarcaciones.....	23
2.1.7.5.	Alteraciones y pérdida de hábitats.....	23
2.1.7.6.	Contaminación por crudo.....	24
2.1.7.7.	Contaminación química.....	24
2.1.7.8.	Ingestión de cuerpos extraños.....	25
2.1.8.	Estudios de campo.....	25
<b>2.2.</b>	<b>Compuestos organoclorados.....</b>	<b>29</b>
2.2.1.	Dicloro difenil tricloro etano (DDT).....	31
2.2.2.	Bifenilos policlorados (PCBs).....	34
2.2.3.	Contaminación y consecuencias por organoclorados.....	39
2.2.4.	Intoxicación por organoclorados en seres humanos.....	44
<b>2.3.</b>	<b>Organoclorados en animales acuáticos.....</b>	<b>49</b>
2.3.1	PCBs en animales acuáticos.....	49
2.3.2	DDTs en animales acuáticos.....	57
2.3.3	Factores biológicos que afectan la persistencia de los niveles de contaminantes en el organismo.....	59
2.3.4	Implicaciones toxicológicas en mamíferos marinos.....	68
<b>2.4.</b>	<b>Organoclorados en reptiles.....</b>	<b>73</b>
<b>2.5.</b>	<b>Organoclorados en tortugas marinas.....</b>	<b>79</b>
2.5.1	Efectos de los organoclorados en tortugas marinas.....	87
<b>2.6.</b>	<b>Detección de organoclorados mediante microextracción en fase sólida (SPME).....</b>	<b>97</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>105</b>
<b>3.1.</b>	<b>Tortugas.....</b>	<b>105</b>
<b>3.2.</b>	<b>Necropsias.....</b>	<b>107</b>
<b>3.3.</b>	<b>Estudio histológico.....</b>	<b>107</b>
<b>3.4.</b>	<b>Aislamiento e identificación microbiológica.....</b>	<b>107</b>
<b>3.5.</b>	<b>Estudio parasitológico.....</b>	<b>108</b>

---

<b>3.6. Estudio toxicológico</b> .....	108
3.6.1. Toma de muestras.....	108
3.6.2. Reactivos y patrones.....	109
3.6.3. Material instrumental.....	109
3.6.4. Análisis químico.....	110
3.6.5. Estudio estadístico.....	115
3.6.6. Detección de organoclorados en muestras de sangre.....	116
3.6.7. Microextracción en fase sólida (SPME).....	117
<b>4. RESULTADOS</b> .....	125
<b>4.1. Estudio anatomopatológico</b> .....	125
<b>4.2. Informes de necropsia</b> .....	127
<b>4.3. Detección de organoclorados</b> .....	161
4.3.1. PCB 180.....	169
4.3.2. PCB 153.....	169
4.3.3. PCB 209.....	169
4.3.4. PCB 138.....	170
4.3.5. PCB 28, 31, 52.....	170
4.3.6. PCB 101.....	171
4.3.7. 2,4'-DDT.....	172
4.3.8. 2,4'-DDD.....	172
4.3.9. 2,4'-DDE.....	172
4.3.10. Estudio estadístico.....	175
4.3.11. Detección de organoclorados en muestras de sangre.....	178
4.3.12. Microextracción en fase sólida (SPME).....	178
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	183
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	201
<b>7. RESUMEN</b> .....	205
<b>8. SUMMARY</b> .....	209

<b>9. AGRADECIMIENTOS</b> .....	213
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	217





INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las tortugas marinas surgieron hace más de 200 millones de años, a finales del Triásico, lo que las convierte en uno de los grupos de seres vivos más primitivos que existen en la actualidad. Pertenecientes al grupo de los reptiles, primeros vertebrados que adquirieron una total independencia del agua hace unos 280 millones de años, las tortugas marinas colonizaron el medio marino junto a otra gran variedad de reptiles tal como el ictiosaurus y el plesiosaurus. Si bien durante el período Jurásico, hace 150 millones de años, este grupo de vertebrados se convirtió en el más importante, la llamada “Edad de Oro de los Reptiles”, a finales del Cretácico se produjo una extinción masiva de numerosas formas reptilianas, quedando sólo, como un pequeño reflejo del anterior esplendor, los grandes grupos que han perdurado hasta la actualidad. Dentro de éstos, las tortugas marinas continuaron su desarrollo y expansión, llegando a contabilizarse poblaciones de varios millones de ejemplares durante los siglos XVIII y XIX. Actualmente, el orden *Chelonia*, al que pertenecen estos animales, es sin duda uno de los grupos animales más logrados, hasta el hecho de conservar casi sin modificaciones la singular y característica arquitectura corporal que los define desde hace 200 millones de años. El caparazón resulta sin duda, la base fundamental del éxito evolutivo de este diferente e interesante grupo entre los vertebrados (FERRI, 1999). Ha sido en el último siglo cuando, debido entre otras causas a la acción humana, y a



enfermedades graves como la fibropapilomatosis, sus poblaciones se han visto reducidas drásticamente (LUTZ & MUSICK, 1997).

De las siete especies de tortugas marinas reconocidas en la actualidad, cinco se han citado en las costas de las Islas Canarias: la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*), la tortuga boba (*Caretta caretta*), la tortuga verde (*Chelonia mydas*), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), y la tortuga golfina (*Lepidochelys kempii*) (MATEO *et al.*, 1997; BARBADILLO *et al.*, 1999). Todas estas especies se contemplan como especies en peligro de extinción en el “*Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias*”, según el *Decreto 151/2001*, de la Comunidad Autónoma de Canarias.

Globalmente, todas las especies de tortugas marinas, salvo la tortuga franca oriental (*Natator depressus*) para la cual no existen datos suficientes, se consideran como especies *en peligro* o *en peligro crítico de extinción* (IUCN, 2006). Entre las grandes amenazas a la supervivencia de las poblaciones de las tortugas marinas destacan las derivadas de la actividad humana, entre las cuales se citan: la alteración de sus hábitats, la captura de huevos, crías y ejemplares, y las consecuencias de la actividad pesquera (WALDICHUK, 1987; HUTCHINSON & SIMMONDS, 1992; GARDNER & NICHOLS, 2001). Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos que los contaminantes ambientales ocasionan en los ejemplares de las tortugas marinas y, por tanto, en el estado de sus poblaciones (HERBST & KLEIN, 1995).

La sociedad actual resulta del enorme desarrollo de la práctica industrial y agrícola, lo que supone un aumento en el uso de una gran variedad de productos químicos. Estos compuestos, sus derivados y los generados durante el proceso de su producción, suelen acabar en el mismo reservorio que la mayoría de la basura de la sociedad, el mar.

Los compuestos organoclorados, como los bifenilos policlorados (PCBs), y el dicloro difenil tricloroetano, junto a sus derivados, (DDTs), se han dispersado por todas las regiones geográficas como resultado de las actividades agrícolas e industriales. Los primeros PCBs se introdujeron en 1929 y el primer DDT sintetizado data de 1938. Fue en 1940 cuando comenzó una masiva producción y uso de estos compuestos. Actualmente, el transporte atmosférico es reconocido como la principal causa de su dispersión (TAKEOKA *et al.*, 1991), y la primera fuente de contaminación de las regiones polares y ambientes de mar abierto (ONO *et al.*, 1987; BACON *et al.*, 1992).

La contaminación por compuestos organoclorados ha sido documentada desde finales de los años 60 (RISEBROUGH *et al.*, 1968, 1976; TANABE *et al.*, 1983; IWATA *et al.*, 1993). Se utilizaron de manera importante en la industria y en la agricultura, hasta que en 1970 la mayoría de ellos fueron prohibidos en la casi totalidad de los países desarrollados a causa de los efectos adversos observados en organismos de vida libre y la potencial amenaza que representaban para la salud humana. Sin embargo, los compuestos organoclorados continúan siendo detectados en las diferentes muestras ambientales y en los tejidos animales debido a su estabilidad, su enorme capacidad de bioacumulación, su presencia global en los diferentes ecosistemas y su continua utilización en algunos países en vía de desarrollo (IWATA *et al.*, 1994; LETCHER *et al.*, 1995; RYBITSKI *et al.*, 1995). Presentan una gran resistencia frente a la metabolización, lo que, unido a su elevada lipoafinidad, hace que tras su ingestión sean acumulados en las reservas lipídicas de las diferentes especies de vertebrados (COLBORN & SMOLEN, 1996).

A causa de la tendencia de los organoclorados a la bioacumulación dentro de las cadenas tróficas, se pueden llegar a medir niveles considerables en los tejidos de las diferentes especies animales, incluido el caso del ser humano, o en sus sistemas de nutrición tales como el cordón umbilical, los huevos y/o la leche maternal. Ello puede desembocar en la exposición del individuo a altos niveles de contaminantes durante las fases de desarrollo, momentos en los que los efectos tóxicos pueden resultar más adversos que los ocurridos en etapas adultas (BERN, 1992; THOMAS & COLBORN, 1992).

Las concentraciones de organoclorados más frecuentemente detectadas en las diferentes muestras de tejidos biológicos no se consideran cancerígenas ni responsables directos de la muerte del organismo. Sin embargo, conducen a una serie de efectos crónicos que los hace ser considerados disruptores hormonales, inmunosupresores, así como ocasionar efectos adversos en el sistema reproductivo y nervioso de los organismos (COLBORN & SMOLEN, 1996).

Debido a su toxicidad y persistencia medioambiental, resultan importantes los estudios de detección de niveles de organoclorados en las poblaciones de animales de vida libre. Y ello es especialmente relevante para aquellas especies, que como las tortugas marinas, se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, pues los efectos que los compuestos organoclorados ocasionan en el organismo podrían contribuir al decline de tales poblaciones.

Previo a 1983 no se realizó ninguna investigación sobre los niveles de organoclorados en ejemplares de tortugas marinas. La mayor información al respecto se refería a las concentraciones de compuestos organoclorados en huevos o en tejidos de tortugas semiacuáticas (CLARK & KRYNITSKY, 1985; COBB & WOOD, 1997; GORDON *et al.*, 1998; ALAM & BRIM, 2000). Afortunadamente, y gracias a la mayor conciencia que se ha creado en torno al peligro de extinción que sufren las tortugas marinas, hoy en día ya contamos con diferentes estudios cuyo objetivo común, de una u otra manera, es el conocer más profundamente la biología que envuelve a estos organismos, y conseguir así una actuación más eficaz a favor de la supervivencia de estos ancestros y fascinantes seres.

Un importante problema al que nos enfrentamos en el estudio de detección de los niveles de organoclorados en las tortugas marinas varadas en nuestras costas, es lo tedioso que resultan los métodos analíticos que conllevan el estudio a partir de muestras de tejido animal. Ello nos ha llevado a experimentar con nuevas técnicas de detección, que si bien ya habían sido empleadas anteriormente, no se habían conseguido optimizar para estudios realizados sobre tejido animal.

El método de análisis elegido ha sido el desarrollado por TANABE *et al.*, en 1994. Si bien el método supone unos niveles de recuperación altamente destacables, es necesario mencionar que al igual que la mayoría de los análisis más eficaces en el aislamiento de sustancias organocloradas, precisa de un complejo y costoso sistema de purificación tras la extracción con disolventes orgánicos, que evite el daño de la columna y la contaminación de los detectores empleados en el cromatógrafo de gases. Ello convierte este tipo de metodología en inusual por la gran cantidad de tiempo requerido en los procesos de limpieza y el elevado consumo de costosos disolventes orgánicos que amenazan al medioambiente aun estando al servicio de un estudio dirigido a su conservación.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica novedosa en la detección de compuestos organoclorados que implica un menor gasto de disolventes orgánicos y una más rápida y sencilla ejecución respecto a los métodos tradicionales. En esta técnica, introducida por PAWLISZYN *et al.* a principios de 1990 (BELARDI & PAWLISZYN, 1989; ARTHUR & PAWLISZYN, 1990), los pasos de extracción y concentración en la fase de preparación de la muestra se simplifican en una sola etapa, lo que supone una reducción del tiempo de análisis y de la manipulación de las



muestras, así como una disminución de los errores generados por la introducción de pasos adicionales. La SPME ha sido utilizada y revisada en el estudio de muestras de agua, sustancias biomédicas y fluidos biológicos, pero no en el caso de tejido animal por lo complicado de su composición matricial.

Dada las peculiaridades del medio marino en el que habitan y en función del creciente interés por la Ecopatología, el estudio patológico y toxicológico de las tortugas marinas varadas en nuestras costas permite a su vez conocer las condiciones y el “estado de salud” de las aguas que nos rodean, comportándose de esta manera como verdaderos bioindicadores de los océanos.

Por todo ello planteamos la presente Tesis Doctoral *Detección de compuestos organoclorados en tortugas marinas varadas en Las Islas Canarias y causas de mortalidad*, con los siguientes **objetivos**:

1. Determinar los niveles y compuestos organoclorados que existen en los tejidos de las tortugas marinas varadas en las Islas Canarias y su distribución orgánica (hígado y tejido adiposo).
2. Establecer una posible relación entre las concentraciones de organoclorados detectadas y las patologías y causas de muerte de los diferentes ejemplares.





REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## **2.1 PRINCIPALES PATOLOGÍAS DESCRITAS EN TORTUGAS MARINAS**

### **2.1.1. PROBLEMAS NUTRICIONALES Y METABÓLICOS**

Es frecuente la observación de signos de malnutrición en aquellas tortugas que presentan algún problema físico o médico afectando a extremidades, boca y ojos, que les impida su acceso normal al alimento. Aquellos animales que presentan alguna enfermedad crónica y/o alta carga parasitaria pueden presentar miopatía caquética caracterizada por atrofia muscular, ojos hundidos, plastrón cóncavo, marcada reducción del peso, atrofia serosa de la grasa, anemia, hipoproteinemia e hipoglucemia (GLAZEBROOK & CAMPBELL, 1990a).

También se han descrito casos de enfermedad ósea metabólica debido a dietas bajas en calcio y altas en fósforo, con desmineralización ósea y fracturas espontáneas (FOWLER, 1986; GLAZEBROOK & CAMPBELL, 1990b) Se han observado además deficiencias de yodo en ejemplares juveniles con anemia alimentados exclusivamente a base de pescado (GEORGE, 1997).

## **2.1.2. ENFERMEDADES BACTERIANAS**

Los traumatismos afectando a los tejidos dérmicos y la aspiración de agua marina se consideran como las vías primarias de infección bacteriana en tortugas marinas, originando abscesos y neumonías por aspiración respectivamente. Una vez instaurada la infección, el agente patógeno puede diseminarse vía sanguínea y originar una septicemia frecuentemente mortal.

Las bacterias más frecuentemente cultivadas a partir de tortugas marinas son *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Mycobacterium* sp., *Edwardsiella* sp. y *Flavobacterium* sp. A menudo se aíslan diversas bacterias de una misma lesión, siendo difícil determinar cuál es el agente patógeno primario y qué organismos actúan como contaminantes (GEORGE, 1997).

### **2.1.2.1. Estomatitis ulcerativa - rinitis obstructiva - bronconeumonía**

Se ha descrito un grupo de enfermedades bacterianas conocido como Estomatitis Ulcerativa-Rinitis Obstructiva-Bronconeumonía originando altas tasas de mortalidad próximas al 70 % en ejemplares juveniles y alevines de tortuga boba y tortuga verde, debidas a la infección por *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* y *Flavobacterium* sp. (GLAZEBROOK *et al.*, 1993). El primer signo clínico de la enfermedad es la presencia de material caseoso en orificios nasales u orofaringe. Las tortugas enfermas cesan de comer, se muestran apáticas y flotan. Si la enfermedad afecta al pulmón, existen problemas de flotabilidad de forma bilateral o unilateral. Las lesiones observadas tras la necropsia son presencia de material caseoso en cavidad nasal, cavidad oral, tráquea y bronquios. La mucosa oral puede estar inflamada o ulcerada, localizándose las lesiones preferentemente en los laterales de la lengua y en el área caudal del paladar duro. Los pulmones, si están afectados, pueden presentar áreas de neumonía focal o bronconeumonía difusa (GLAZEBROOK *et al.*, 1993).

### **2.1.2.2. Micobacteriosis**

Las micobacteriosis no son muy frecuentes en tortugas marinas, estando asociadas al aislamiento de *Mycobacterium avium* y *M. marinum* (GLAZEBROOK & CAMPBELL, 1990a). Es de destacar que *M. marinum* puede cultivarse a partir del agua de mar, posibilitando la infección por ingestión o aspiración de ésta.

### **2.1.2.3. Infecciones dérmicas bacterianas**

Existen también referencias sobre una enfermedad ulcerativa dérmica o dermatitis ulcerativa profunda en *Caretta caretta* (WILES & RAND, 1987). Macroscópicamente aparecen lesiones en la piel de cuello, cola y regiones inguinal y axilar. Las lesiones son subcutáneas, con áreas blancas de aspecto cremoso, úlceras hemorrágicas en piel con destrucción tisular, eritema y exudado.

Las enfermedades de la piel son comunes en las tortugas cautivas. Están causadas por abrasiones, mordeduras, parásitos, hongos, virus, neoplasias y traumas. Se han aislado *Vibrio alginolyticus*, *Proteus* sp., *Acinetobacter calcoaceticus* var. Lwoffii, *Pasteurella* sp., *Salmonella* sp., y un hongo branquiseptado (WILES & RAND, 1987).

### **2.1.2.4. Encefalitis bacterianas**

Existen varias descripciones de encefalitis bacteriana de carácter multifocal en ejemplares juveniles varados de *C. caretta* (GEORGE *et al.*, 1995). Las lesiones histológicas consistieron en meningoencefalitis granulomatosa con presencia de células gigantes multinucleadas, asociadas al aislamiento de *Corynebacterium* sp.

### **2.1.2.5. Clamidiasis**

Mientras que las infecciones por *Chlamydia psittaci* son comunes en mamíferos y aves, éstas son poco frecuentes en reptiles. Sin embargo existen algunas descripciones de brotes epidémicos afectando a ejemplares juveniles de *Chelonia mydas* resultando en la muerte de varios cientos de estos animales, tras mostrarse letárgicas, débiles, anoréxicas y encontrarse flotando sobre la superficie (HOMER *et al.*, 1994). Macroscópicamente se observaron lesiones nodulares en el corazón, múltiples focos pequeños de 1 a 10 mm de color gris pálido, junto a hepatomegalia y disminución de la consistencia hepática. Las lesiones histológicas consistieron en necrosis de hepatocitos y células miocárdicas. Al microscopio se observó una miocarditis necrótica, esplenitis fibrinosa y esteatosis y necrosis.

### **2.1.3. ENFERMEDADES MICÓTICAS**

#### **2.1.3.1 Micosis superficiales**

Debido a sus hábitos más bien solitarios, las tortugas marinas de vida libre son menos susceptibles a las infecciones por hongos que aquellos animales mantenidos en cautividad. Dentro de las micosis superficiales o dérmicas, el hongo más frecuentemente aislado es *Aspergillus* sp. (GEORGE, 1997). Las extremidades suelen ser las partes más afectadas llegando incluso a la autoamputación en los casos más severos. La calidad del agua parece ser un factor importante en la aparición de estas micosis.

SISON *et al.* (1990) estudiaron las lesiones necróticas en la piel de cabeza y cuello que presentaron 10 tortugas carey (*Eretmochelys imbricata*), mantenidas en cautividad en las islas Filipinas. El cultivo de muestras de estas lesiones demostró el crecimiento de hongos *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Scolecobasidium* sp., *Fusarium* sp. y *Drechslera* sp.

#### **2.1.3.2 Micosis sistémicas**

En cuanto a las micosis sistémicas, el órgano primariamente afectado es el pulmón, aunque también se describen granulomas micóticos en el hígado y en la cavidad celómica. Los animales afectados frecuentemente presentan problemas en la flotabilidad, bien de forma bilateral o más frecuentemente unilateral (JACOBSON *et al.*, 1979).

Los hongos más frecuentemente aislados en las micosis sistémicas son *Paecilomyces* sp., *Sporotrichium* sp., *Scolecobasidium* sp., y *Cladosporium* sp. (JACOBSON *et al.*, 1979; GLAZEBROOK & CAMPBELL, 1990a; POSTHAUS *et al.*, 1997). Recientemente ha sido descrito un caso de micosis pulmonar causado por *Fusarium* sp. en un ejemplar de tortuga golfina (*Lepidochelys kempi*) (ORÓS *et al.*, 2004c). También ha sido descrito un caso de candidiasis intestinal en una tortuga boba cuyo diagnóstico se realizó mediante técnicas inmunohistológicas (ORÓS *et al.*, 2004a)

### **2.1.4. ENFERMEDADES VÍRICAS**

Sólo se han descrito dos enfermedades víricas en tortugas marinas: la enfermedad respiratoria por herpesvirus (HRD) y la “gray-patch disease” (GPD). La

fibropapilomatosis de las tortugas marinas puede tener también un origen vírico, pero debido a su importancia se desarrollará en el siguiente apartado.

#### **2.1.4.1 Enfermedad respiratoria por herpesvirus**

La enfermedad respiratoria por herpesvirus o “LET disease” (“lung, eye and trachea disease”) se describió en 14 ejemplares de *Chelonia mydas* de 15-20 meses de edad con signos clínicos respiratorios. Los animales afectados presentaron conjuntivitis purulenta, estomatitis necrótica, traqueitis y bronconeumonía (JACOBSON *et al.*, 1986). Macroscópicamente se observó necrosis periglotal, traqueitis con exudado caseoso intraluminal y restos necróticos. La enfermedad progresó hacia una neumonía severa que se tradujo en flotación anormal, ladeada y dificultad o imposibilidad de sumersión. También se observó exudado caseoso conjuntival cubriendo los ojos.

Microscópicamente se constató la presencia de inflamación fibrino-necrótica periglotal con infiltración mixta en submucosa compuesta por heterófilos, linfocitos y células plasmáticas; traqueitis, en estados avanzados presentando necrosis extensa; bronconeumonía severa; y neumonía intersticial.

Se ha logrado cultivar el virus usando cultivos celulares a base de células de riñón de tortuga verde, observándose efecto citopático caracterizado por la formación de células gigantes y cuerpos de inclusión intranucleares. En los tejidos infectados se hallaron cuerpos de inclusión intranucleares, y mediante microscopía electrónica se detectaron partículas víricas compatibles con herpesvirus en base al tamaño (132-147 nm), localización, conformación y presencia de envoltura.

#### **2.1.4.2. Gray-patch disease**

La enfermedad conocida como “Gray-patch disease” es una enfermedad causada por un herpesvirus que afecta principalmente a ejemplares juveniles de tortuga verde (HAINES, 1978). Se trata de una enfermedad que cursa con lesiones en la piel, que pueden ser de dos tipos: pápulas o “parches grises”, con necrosis superficial de la epidermis. Las lesiones en “parche gris” aumentan su tamaño a medida que evoluciona la enfermedad (aprox. 5 mm/semana). La mortalidad se sitúa entre el 5 y el 20 %. Se ha demostrado que el estrés inducido por las altas temperaturas favorece la infección y agrava la severidad de las lesiones (HAINES & KLEESE, 1977).



### 2.1.5. FIBROPAPILOMATOSIS

Las primeras descripciones de tumores cutáneos identificados como fibropapilomas en tortuga verde (*Chelonia mydas*) datan de 1930 en las costas de Florida (LUCKÉ, 1938; SMITH & COATES, 1938). Posteriormente la enfermedad fue detectada también en ejemplares mantenidos en cautividad en las Islas Caimán (JACOBSON *et al.*, 1989). Desde entonces la fibropapilomatosis de las tortugas marinas se considera una enfermedad de distribución mundial, y se han realizado numerosas observaciones de la misma en las costas de Hawaii, Puerto Rico, Barbados, Islas Vírgenes, Panamá, Colombia, Venezuela, Belice, Australia y, más recientemente, Indonesia (BALAZS, 1991; EHRHART, 1991; JACOBSON *et al.*, 1991; TEAS, 1991; ADNYANA *et al.*, 1997). La prevalencia de la enfermedad se ha ido incrementando de forma alarmante a partir de los años 80, de tal modo que en determinadas áreas de Florida y Hawaii, ésta se estima actualmente en más de un 50 %, llegando a alcanzar el 92 % en algunas áreas (BALAZS, 1991). Aunque la enfermedad fue inicialmente descrita en *Chelonia mydas* (de donde toma su denominación, GTFP, green turtle fibropapillomatosis), también se ha citado en *Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea*, *Eretmochelys imbricata* y *Natator depressus* (HERBST, 1994).

La enfermedad se caracteriza por la aparición de múltiples tumores cutáneos de naturaleza fibroepitelial en cuello, conjuntiva ocular, extremidades, cola, regiones axilares e inguinales, caparazón y plastrón (JACOBSON *et al.*, 1989). Las tortugas afectadas se suelen mostrar emaciadas, débiles y anémicas, y la afectación ocular suele conllevar ceguera. Los fibropapilomas oculares tienen su origen en párpado, conjuntiva, limbo y córnea, conllevando la ceguera de los ejemplares afectados en la mayoría de los casos (BROOKS *et al.*, 1994). También se han descrito fibromas en órganos internos como pulmón, hígado, riñón y tracto gastrointestinal, originando alteraciones en la flotabilidad, necrosis por presión del parénquima hepático, fallo renal y obstrucción intestinal respectivamente (HERBST, 1994).

Histológicamente los tumores cutáneos muestran una hiperplasia epidérmica papilar y/o proliferación hiperplásica de la dermis, mostrándose como lesión inicial una degeneración vacuolar de las células epidérmicas del estrato basal (JACOBSON *et al.*, 1989). Es frecuente la observación de huevos de trematodos espirórcidos en el componente dermal de los fibropapilomas (AGUIRRE *et al.*, 1998), llegando incluso a considerarse como un posible agente etiológico de esta enfermedad, aunque estudios

experimentales consistentes en la inoculación intradérmica de suspensiones de trematodos espirórkidos han descartado esta teoría (HERBST *et al.*, 1995).

Los tumores viscerales han sido identificados en todos los casos como fibromas y/o mixofibromas (NORTON *et al.*, 1990). Mediante estudios de citometría de flujo se ha confirmado el carácter no maligno de las células de estas proliferaciones tumorales (PAPADI *et al.*, 1995).

Estudios experimentales han demostrado que un agente infeccioso subcelular y sensible al cloroformo está implicado en la etiopatogenia de estos tumores, sospechándose de un herpesvirus (HERBST *et al.*, 1995; HERBST *et al.*, 1996). Mediante estudios de microscopía electrónica se han detectado inclusiones víricas intranucleares compatibles con las características de la familia Herpetoviridae (JACOBSON *et al.*, 1991), si bien hasta el momento no se ha logrado aislar el agente etiológico. Recientemente muestras de tumores procedentes de ejemplares de *Ch. mydas* en Hawaii han mostrado actividad transcriptasa inversa, confirmándose mediante microscopía electrónica la presencia de partículas víricas compatibles con retrovirus (CASEY *et al.*, 1996, 1997).

AGUIRRE *et al.* (1994) realizaron un estudio con 10 tortugas verdes con fibropapilomatosis, con el fin de hallar una relación entre la enfermedad y la posible presencia de contaminantes orgánicos y trazas de metales pesados. Ninguno de los metales encontrados superó los valores habituales para tortugas marinas sanas, descartándose cualquier relación entre la presencia de metales pesados y la fibropapilomatosis. Se había sugerido que la acción de agentes inmunosupresores, entre éstos los contaminantes ambientales como los compuestos organoclorados, podían activar a virus latentes o aumentar su virulencia (GAMACHE & HORROCKS, 1992; BALAZS & POLEY, 1991; HUTCHINSON & SIMMONDS, 1991). En base al estudio realizado por AGUIRRE *et al.* (1994) se puede concluir que la acción de contaminantes ambientales no parece jugar de forma evidente, ningún papel importante en el desarrollo de la fibropapilomatosis de las tortugas marinas, si bien no pueden descartarse los efectos crónicos que producen y que conducen a un estado precario del organismo.

## **2.1.6. ENFERMEDADES PARASITARIAS**

### **2.1.6.1. Endoparásitos protozoos**

Se han descrito casos de amebiasis originados por *Entamoeba invadens* tanto en *Caretta caretta* como en *Chelonia mydas* (GEORGE *et al.*, 1990). Puesto que *E. invadens* no puede vivir en agua salada, sólo ha sido descrita en animales mantenidos en cautividad. Las lesiones consisten en una enterohepatitis, y los animales afectados presentan recuentos leucocitarios elevados, niveles elevados de enzimas hepáticas (SGOT/AST), y presencia de amebas en heces.

Se han descrito brotes de coccidiosis asociados a enteritis ulcerativa originados por *Caryospora cheloniae* (LEIBOVITZ *et al.*, 1978; GORDON *et al.*, 1993). Las tortugas afectadas por *Caryospora cheloniae* pueden presentar depresión y debilidad pronunciada, diarrea, ojos hundidos (debido a la deshidratación) y signos neurológicos (balanceo de cabeza, nistagmo y torneo). También ha sido descrita la presencia de *Eimeria caretta* en dos ejemplares de tortuga boba en los que se analizaron de forma rutinaria sus heces, en ausencia de lesiones intestinales (UPTON *et al.*, 1990).

Por otra parte, se han identificado ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en muestras fecales e intestinales de tortugas verdes de vida libre, en las islas Hawaii (GRACZYK *et al.*, 1997).

### **2.1.6.2. Endoparásitos helmintos**

No existen referencias de infestaciones por cestodos. La mayoría de los nematodos descritos en estos reptiles son vermes similares a los ascáridos, y residen en el área píloroduodenal del tracto gastrointestinal. Nematodos anisákidos como *Sulcascaris sulcata* (Nematoda: Ascaridoidea) están ampliamente distribuidos a nivel mundial y se pueden encontrar en varias especies de tortugas marinas (KINNE, 1985). Las tortugas son parasitadas en aquellas zonas donde el estadio larval se encuentra en los moluscos, su hospedador intermediario (LICHTENFELS *et al.*, 1978). Pueden causar una ligera enteritis hemorrágica y su sintomatología clínica es escasa salvo en parasitaciones severas. Las tortugas marinas resultan infectadas al ingerir el tercer estadio larval de *Sulcascaris sulcata* localizado en diferentes moluscos y bivalvos (CANNON & BERRY, 1981). Los adultos de esta especie de nematodos se localizan en el estómago de las tortugas, eliminando huevos por las heces, iniciándose de nuevo el ciclo del parásito.

Los trematodos espirórkidos son los endoparásitos más dañinos en las tortugas marinas. Los parásitos adultos viven en los vasos sanguíneos y originan vasculitis y trombosis (GORDON *et al.*, 1998). Sus huevos se diseminan a través del sistema vascular y originan vasculitis y reacciones granulomatosas en cerebro, pulmón, hígado, riñón, e intestino. Se ha considerado que hasta el 30 % de la población de tortuga boba del Atlántico se encuentra parasitada (WOLKE *et al.*, 1982). Los cuatro géneros de espirórkidos más comunes son *Haplotrema*, *Learedius*, *Carettacola* y *Neospororchis*. Se desconoce el hospedador intermediario que contiene las cercarias infestantes.

## **2.1.7. PATOLOGÍA MEDIOAMBIENTAL DERIVADA DE ACTIVIDADES HUMANAS**

### **2.1.7.1. Enmallamientos**

Son muy frecuentes los problemas de enmallamiento con una gran variedad de artes de pesca. Por un lado se pueden producir lesiones lineales necróticas que pueden resultar en amputación de alguna de las extremidades, mientras que en el caso de los animales que permanecen atrapados sumergidos durante un período de tiempo prolongado se puede llegar a estados de anoxia, coma y muerte por ahogamiento (GEORGE, 1997).

### **2.1.7.2. Pesca accidental**

La pesca “accidental” en redes de deriva, bien por ahogamiento o por la ingestión de anzuelos de los palangres marrajeros es la causa principal de mortalidad debida a la actividad humana. Así, entre 1983 y 1991 fueron capturadas más de 3000 tortugas en aguas internacionales al norte de Canarias (LÓPEZ-JURADO & GONZÁLEZ, 1983; BLANCO & GONZÁLEZ, 1992). Aunque la mayor parte de los animales son devueltos al mar, se estima que mueren entre el 15 y el 50 % de los individuos capturados como consecuencia de las lesiones producidas por los anzuelos (LIZANA & BARBADILLO, 1997).

### **2.1.7.3 Traumatismos por embarcaciones**

Existen datos sobre ejemplares varados en el Golfo de México entre 1986 y 1993, calculándose en torno al 9 % de los varamientos los casos donde estuvieron implicadas embarcaciones comerciales o de recreo (SCHROEDER, 1987; TEAS, 1994). En

Florida la incidencia se estimó en un 18 % sobre un total de 2156 varamientos entre 1991 y 1993 (GEORGE, 1997).

#### **2.1.7.4. Alteración y pérdida de hábitats**

El efecto del hombre se hace notar con frecuencia en las playas en las que las tortugas marinas realizan las puestas. En aquellos lugares en los que se llevan a cabo programas de conservación, la técnica más usada es el traslado de los huevos de la playa a criaderos, sobre todo cuando el desarrollo embrionario o de los alevines se ven seriamente afectados por la acción humana en la playa (recolección de huevos para consumo, erosión de la playa, luz artificial, tráfico de vehículos y personas, etc.) (GEORGE, 1997).

La luz artificial en las playas donde las tortugas realizan su puesta de huevos es perjudicial para éstas, ya que interfiere en la localización de los sitios de puesta y el camino de vuelta al mar, tanto para las hembras adultas como para las tortugas recién salidas de los huevos. Hay evidencias asociativas y experimentales directas de que la luz artificial en las playas disuade a las tortugas de usarlas como lugares de puesta. (WITHERINGTON, 1992). Las puestas en playas con luz artificial o cerca de éstas pueden presentar una alta mortalidad en los alevines. Los alevines se mueven siguiendo la fuente de luz artificial, que brillan con mayor intensidad que la luz que refleja el mar, muriendo agotadas, por deshidratación o por depredadores (MANN, 1978; PETERS & VERHOEVEN, 1994; SALMON & WITHERINGTON, 1995).

#### **2.1.7.5. Contaminación por crudo**

Las tortugas marinas se ven expuestas a los efectos nocivos del petróleo de diferentes maneras. Los ejemplares adultos al respirar a través de la capa flotante de petróleo experimentarán un contacto prolongado con el crudo. El modo de respirar de las tortugas, una rápida inspiración del aire de la superficie antes de la inmersión, puede introducir vapor de petróleo en sus pulmones. Al comer alimentos contaminados o bolas de crudo lleva éstos al intestino. En las playas de puesta los depósitos de petróleo interfieren en el desarrollo de los embriones, al igual que representa un enorme riesgo para los alevines. Todas las especies de tortugas marinas y todos sus estadíos de vida están expuestos a los efectos perjudiciales de la contaminación por petróleo en el mar, por contacto directo o por la alteración de sus hábitats (LUTZ *et al.*, 1986; LUTCAVAGE *et al.*, 1995).

#### **2.1.7.6. Contaminación química**

En cuanto a los contaminantes químicos, no todas las especies de tortugas marinas acumulan la misma cantidad de residuos en sus tejidos. De forma constante, los ejemplares de *Caretta caretta* acumulan mayores niveles de PCBs y DDE que los ejemplares de *Chelonia mydas*, hipotetizándose que esta variación se debe a las diferencias en sus dietas (GEORGE, 1997).

Las tortugas marinas pueden tener unas expectativas de vida de más de 50 años, y pueden acumular a lo largo de su vida diferentes metales pesados y pesticidas en su organismo. En la zona de costa, la polución crónica derivada de la actividad industrial, de la agricultura y aguas residuales es una amenaza para las tortugas marinas (FRAZIER, 1980; CLARK & KRYNITSY, 1985; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1990; HUTCHINSON & SIMMONDS, 1992). En la bahía de Chesapeake (Virginia, EE.UU.), se encontró DDT y sus metabolitos DDE y DDD en las gónadas, grasa, hígado y tejido muscular de especímenes de *Caretta caretta* y *Lepidochelys kempfi* (RYBITSKI *et al.*, 1995). En algunos mamíferos marinos, la contaminación debida a actividades agroindustriales se ha relacionado con fenómenos de inmunosupresión, lo cual se puede extrapolar a las tortugas marinas.

#### **2.1.7.7. Ingestión de cuerpos extraños**

La ingestión de restos antropogénicos es relativamente frecuente y puede causar daños directos e indirectos. La ingestión de plásticos y otros materiales similares pueden producir una obstrucción intestinal o causar una enteritis necrótica o ulcerativa. Indirectamente, esta ingestión también puede interferir con el metabolismo lipídico, incrementando el tiempo de tránsito intestinal o contribuyendo al acúmulo de gas intestinal y alterando el control en la flotabilidad del animal (SCHULMAN & LUTZ, 1995), incrementando el riesgo de colisión con embarcaciones, la captura accidental o el riesgo de sufrir depredación.

Se han diagnosticado en numerosas ocasiones cuerpos extraños gastro-intestinales en las tortugas marinas (GRAMENTZ, 1988; PLOTKIN, 1989).

### 2.1.8. ESTUDIOS DE CAMPO

GLAZE BROOK & CAMPBELL (1990a, b) realizaron dos estudios de campo sobre tortugas marinas (de granja y de vida libre), analizando los procesos morbosos que presentaban. En el estudio sobre tortugas de granjas, analizaron 104 tortugas (102 *Chelonia mydas* y 2 *Eretmochelys imbricata*). En total se diagnosticaron 28 enfermedades, incluyendo 12 de origen bacteriano, 4 parasitarias y 4 enfermedades nutricionales. Las menos frecuentes fueron enfermedades congénitas o de origen medioambiental.

Las lesiones en la piel debidas a mordeduras (dermatitis traumática ulcerativa) estuvieron presentes en la práctica totalidad de tortugas de granja. Se realizaron cultivos a partir de muestras de estas lesiones, creciendo una gran variedad de bacterias: *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp. y *Bacillus* sp. La estomatitis ulcerativa fue la enfermedad bacteriana más frecuente en las tortugas de granjas tras la dermatitis traumática ulcerativa. La estomatitis ulcerativa tuvo como complicaciones rinitis obstructiva y neumonía. Las neumonías se caracterizaron por presentar lesiones nodulares en la porción apical o medial del pulmón. Se consiguió aislar *V. alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium* sp., y *Pseudomonas* sp. de las vías respiratorias altas y bajas, además de la cavidad oral. La presencia de hongos como *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp. y *Rhodotorula* sp. fueron de importancia secundaria.

El síndrome gastritis-serositis fue la enfermedad parasitaria más común observada en las tortugas marinas de granja. Las úlceras gástricas e intestinales y las adherencias fibrosas estaban causadas por la migración y enquistamiento del tercer estadio larval de *Anisakis* sp. desde la luz intestinal hacia la cavidad pleuroperitoneal. En las tortugas de granja se encontraron huevos de trematodos cardiovasculares (Digenea: Spirorchiidae), observándose al microscopio una inflamación crónica.

En el estudio sobre tortugas marinas de vida libre y de oceanarios se examinaron 37 tortugas, 15 de oceanarios (10 *Chelonia mydas*, 2 *Eretmochelys imbricata* y 3 *Caretta caretta*), y 22 tortugas marinas de vida libre (22 *Ch. mydas* y 1 *E. imbricata*). Las enfermedades bacterianas en las tortugas marinas de los oceanarios fueron similares a las descritas en el estudio sobre tortugas marinas en granjas. En el grupo de tortugas marinas de vida libre sólo se diagnosticaron dos enfermedades bacterianas, bronconeumonía y septicemia-toxemia, secundarias a infestaciones por trematodos

cardiovasculares. Se encontraron trematodos cardiovasculares (*Hapalotrema* sp. y *Learedius* sp.) en 5/15 (33.3 %) tortugas marinas de oceanarios y en 9/22 (40.9 %) tortugas marinas de vida libre.

En las Islas Canarias, ORÓS *et al.* (2004b) analizaron las patologías digestivas en tortugas marinas varadas durante el período 1993-2001. Se observaron lesiones digestivas en 84 tortugas de un total de 136 animales (128 tortugas boba, 4 tortugas verdes y 4 tortugas laúd). Las lesiones más frecuentemente observadas en la cavidad oral fueron las estomatitis ulcerativas y necropurulentas. En el esófago destacaron las esofagitis ulcerativas y fibrinosas y las perforaciones de esófago principalmente asociadas con la ingestión de anzuelos. Se observaron diferentes tipos histológicos de gastritis en 35 tortugas. Las gastritis fibrinosas y necropurulentas se asociaron con infecciones bacterianas causadas principalmente por *Proteus* sp., *Vibrio alginolyticus*, y *Staphylococcus* sp. Se observaron formas parasitarias correspondientes a fases larvianas de *Anisakis* asociadas a gastritis en 16 tortugas. Se observaron diferentes tipos histológicos de enteritis afectando a 36 tortugas. Todos los casos de enteritis necrótica estuvieron asociados con intususcepciones intestinales causadas por la ingestión de monofilamentos de pesca. En el hígado las lesiones más frecuentes fueron las hepatitis necróticas y hepatitis granulomatosa multifocal, afectando a 29 tortugas y estando asociadas al aislamiento de *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter* sp., *E. coli*, *Proteus* sp., *Staphylococcus* sp., y *Vibrio alginolyticus*. De acuerdo a las historias clínicas de las tortugas y a las lesiones observadas, los autores concluyeron que 33 tortugas presentaron lesiones digestivas asociadas con la ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca, y 2 tortugas mostraron lesiones digestivas asociadas a la ingestión de crudo.

También en las Islas Canarias ORÓS *et al.* (2005) realizaron un estudio sobre las patologías y causas de mortalidad de 93 tortugas marinas (88 tortugas boba, 3 tortugas verde, y 2 tortugas laúd) varadas durante el período 1998-2001. El estudio evidenció que el 26 % de las tortugas murieron debido a enfermedades espontáneas que incluyeron diferentes tipos de neumonía, hepatitis, meningitis, procesos septicémicos y neoplasias. Sin embargo, un 69.89 % de las tortugas murieron debido a lesiones asociadas con la actividad humana, tal como traumatismos con embarcaciones (23.66 %), enmallamiento en redes de pesca (24.73 %), ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca (19.35 %), e ingestión de crudo (2.15 %).





## 2.2 COMPUESTOS ORGANOCLORADOS

Los compuestos organoclorados son compuestos químicos orgánicos con átomos de cloro, es decir, compuestos cuya estructura principal está formada por una cadena de átomos de carbono, y como grupos sustitutos destaca el átomo de cloro; en algunos casos asociados a átomos de oxígeno y azufre. Son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua. Su peso molecular oscila entre 291 y 545 daltons (WADE, 1993).

Varias son las funciones que han llevado a una elevada manufacturación de los compuestos organoclorados hasta su prohibición en determinados países, destacando su importante papel como insecticidas y como aislantes en equipamientos eléctricos (WHO, 1976; DE VOOGT & BRINKMAN, 1989).

Los compuestos organoclorados fueron los primeros insecticidas de síntesis que se usaron. Anteriormente sólo se usaban insecticidas naturales, tales como la nicotina, el azufre, la *rotenona* (extraída de una planta llamada derris), o el piretro (extraído de las cabezas florales de los crisantemos). Su persistencia fue muy apreciada en la época, pero es sobradamente conocido el problema medioambiental ocasionado al introducirse en la cadena trófica de los seres vivos (WADE, 1993).

Hay cuatro principales familias de derivados organoclorados usados como pesticidas (VOLLHARDT & SCHORE, 2000):

Grupos	Ejemplo
La derivada del hexaclorociclopentadieno ( <b>Ciclodienos</b> )	Aldrin, Dieldrin, Endrin
La derivada del 2,2-difeniletano ( <b>Diclorodifeniletanos</b> )	DDT, Metoxiclor, Dicofol
La derivada del ciclohexano ( <b>Hexaclorociclohexanos</b> )	Lindano
Los de estructura química en forma de caja ( <b>Canfenos</b> )	Declorane, Clordecone

La forma de actuación general de estos compuestos organoclorados es la de contacto, es decir, basta con que el insecto entre en contacto con el producto, para que éste se absorba y ejerza su acción tóxica. Existe entre los insectos una tendencia a desarrollar resistencia ante cada grupo químico, sin llegar a desarrollar una resistencia cruzada (WADE, 1993).

Los PCBs constituyen el otro gran grupo de organoclorados, destacando por su alta estabilidad térmica y su baja solubilidad e inflamabilidad. Estas características son las que convierten a estos compuestos en excelentes materiales aislantes y agentes refrigerantes para transformadores, así como lubricantes, agentes dieléctricos y materiales resistentes al agua, siendo por tanto de gran utilidad en la actividad industrial (EISLER, 1986b).

Dentro de los compuestos organoclorados dos clases se encuentran frecuentemente en las muestras ambientales, los bifenilos policlorados (PCBs) y el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-cloro-fenil)etano (DDT) junto a sus metabolitos, el 1,1-dicloro-2,2-bis(p-cloro-fenil)etano (DDD) y el 1,1-dicloro-2,2-bis(p-cloro-fenil)etileno (DDE). Otros compuestos organoclorados tales como hexaclorobenceno (HCB), aldrín, dieldrín, toxafeno, transnonaclar, endrín, HCH y lindano se detectan también en los distintos ecosistemas pero generalmente en concentraciones muy bajas (RYBITSKI *et al.*, 1995).

La contaminación a nivel mundial por sustancias organocloradas como los PCBs y DDTs ha sido documentada desde finales de los años 60 (COLBORN & SMOLEN, 1996). La fabricación de los PCBs comenzó en 1929 y ha continuado en algunos países hasta hace muy poco tiempo. Se estima que en total se produjeron alrededor de unos 3 millones de toneladas de PCBs, principalmente para uso de equipamiento eléctrico (WHO, 1976; DE VOOGT AND BRINKMAN, 1989). Debido a su persistencia y solubilidad lipídica han sido ampliamente distribuidos por todo el mundo, ocasionando que la concentración de PCBs en organismos vivos haya aumentado de manera regular con el

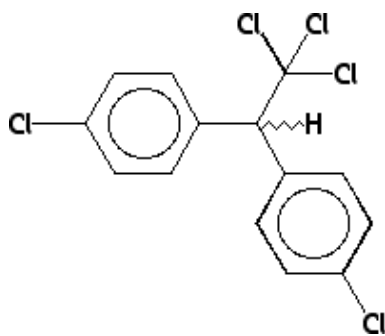
tiempo, al menos hasta mediados de 1970 momento en el que fueron prohibidos en determinados países (KAMRIM & RINGER, 1996).

Como consecuencia de la emisión industrial, concentrada principalmente en el Hemisferio Norte, no sorprende encontrar las muestras de mayores niveles de PCBs en este hemisferio (CONNELL *et al.*, 1999). En el Hemisferio Sur, la mayoría de los países se sostienen en base a la agricultura, resultando que el ratio de compuestos químicos frente a agrícolas (PCB/DDT) es mucho mayor en las muestras del Hemisferio Norte frente a muestras similares procedentes del Hemisferio Sur (BORRELL & AGUILAR, 1999). La persistencia y otras propiedades que influyen en la movilidad de los compuestos organoclorados determinan si éstos permanecen en las mismas áreas de emisión o si son distribuidos mediante el transporte atmosférico y las corrientes marinas (MOORE *et al.*, 2002). Según estudios basados en la descripción de modelos acerca de la distribución global de compuestos orgánicos, la movilidad de los productos químicos está relacionada con la volatilidad y la hidrofobicidad que presentan (WANIA & MACKAY, 1996), así como con determinados factores ambientales entre los que destaca la temperatura (RITTER *et al.*, 1995). Los PCBs, como compuestos orgánicos persistentes con una relativa movilidad, figuran entre las sustancias químicas capaces de alcanzar cualquier región por remota que ésta sea (MOORE *et al.*, 2002). Varios son los estudios que lo verifican, llegando a ser detectados en todos los ecosistemas geográficos, incluso en aquellos de las regiones polares del Ártico y el Antártico, que finalmente resultan ser el vertedero para la mayoría de los contaminantes orgánicos ambientales (SUBRAMANIAN *et al.*, 1983, 1988 a,b; TANABE *et al.*, 1983, 1986; TANABE & TATSUKAWA, 1986).

### **2.2.1. DICLORO DIFENIL TRICLORO ETANO (DDT)**

El primer organoclorado que se sintetizó como insecticida fue el DDT en 1938 (COLBORN & SMOLEN, 1996).

Se trata de un hidrocarburo aromático clorado, el 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (Fig. 2.1) y fue el primero de los insecticidas de 2ª generación. Su conversión a sus metabolitos, el DDD y el DDE se produce mediante reacciones de deshidroclorinación (VOLLHARDT & SCHORE, 2000).



**Fig. 2.1** Estructura química general del dicloro difenil tricloro etano (DDT)

Las primeras moléculas de DDT habían sido sintetizadas en 1874 por Tomar Zeider pero su uso como insecticida no comenzó hasta 1939. Fue el químico suizo Müller quien descubrió en 1936 sus propiedades como veneno para los insectos y su baja toxicidad para los humanos. Müller recibió el Premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1948 en reconocimiento al impresionante avance que este producto había representado en la lucha contra las plagas de moscas, mosquitos y otros insectos (CARLSON, 1962). Además de su uso en la agricultura y silvicultura, el DDT se utilizó como importante herramienta en la dura lucha contra el tifus y la erradicación de la malaria (WHO, 1971). Se calcula que en los primeros años de uso del DDT se evitó la muerte de 5 millones de personas cada año, además de la protección de cosechas y del aniquilamiento de insectos domésticos. Así, por ejemplo, en la India, en 1952 hubo 75 millones de casos de malaria y en 1964, después de usar masivamente el DDT, tan sólo 100.000 casos. Tras la Segunda Guerra Mundial las cantidades usadas se incrementaron exponencialmente (HAYES, 1991). La gran eficacia, persistencia, versatilidad y bajo coste, hicieron que se usara durante 30 años como insecticida después de 1945 (EPA, 1975).

La conciencia sobre los efectos en el medio ambiente comenzó de manera casi inmediata con el estudio de las consecuencias del DDT en peces y en organismos de vida libre (COTTAM & HIGGINS, 1946). Conforme se fueron descubriendo algunos importantes problemas asociados a su uso, empezó a ser cada vez menos usado. En 1970 se obtuvo un pico en la producción de este insecticida, pero desde entonces su uso se ha ido limitando con el tiempo en cada vez más países, originando con ello un desuso. Entre 1970 y 1980 el uso de pesticidas fue prohibido en la mayoría de los países desarrollados, así como en algunos países del Este de Europa, como Rumanía y la URSS (KUTZ *et al.*, 1991). Se sabe que en Turquía se usaron entre 1000 y 2000 toneladas anualmente entre 1976 y 1983 (KARAKAYA & OZLAP, 1987). El uso de estos

químicos en los países que bordean el Mar Negro es incierto. A pesar de las prohibiciones impuestas por alguno de estos países, se han detectado importantes niveles en peces y focas de esta área, lo que sugiere que algunos organoclorados, en particular el DDT, continúan siendo ilegalmente usados en diferentes zonas del mundo. BENÍTEZ & BÁRCENAS (1996) publican que a pesar de haberse prohibido el uso de DDT en Méjico desde 1987, se sigue utilizando como insecticida para el control de los mosquitos en áreas con alto riesgo de malaria. El motivo que dio lugar a este declinar del favor social del DDT fueron los graves problemas que se detectaron. En primer lugar es un producto de lenta conversión a sustancias no tóxicas en la naturaleza; la vida media del DDT y alguno de sus metabolitos es aproximadamente de unos 57 años en suelos de zonas templadas (COOKE & STRINGER, 1982). Sin embargo, poco se sabe sobre la vida media del DDT en las cadenas tróficas. Debido a que la vida media de una sustancia química depende de la temperatura, podrían persistir largos períodos de tiempo en las regiones polares (COLBORN & SMOLEN, 1996). Además es muy poco soluble en agua, lo que hace que no se elimine en la orina, y es muy soluble en grasas, por lo que se acumula en tejidos de los organismos. Por estos motivos se va acumulando a lo largo de la cadena trófica. Así, por ejemplo, el DDT que se extendía sobre un cultivo se encontraba en una concentración bajísima en las plantas; pero en los insectos que se alimentaban de estas plantas aparecía en concentraciones diez veces mayores. Si el insecto resiste al DDT será comido por ranas, por ejemplo, en las que el DDT alcanzará concentraciones 100 veces mayores que las de las plantas; y las rapaces que comen a las ranas llegan a tener concentraciones 1000 veces mayores. Los primeros estudios de campo con DDT fueron sobre los efectos a corto plazo tras duros niveles de aplicación; por ejemplo, 5.6 kg de DDT por hectárea resultaba en la inmediata reducción de la población de pájaros e invertebrados en un bosque del interior (HOTCHKISS & POUGH, 1946). En la actualidad se sabe que la relación aproximada causa-efecto del DDT y la mortalidad puede ocurrir inmediatamente tras su aplicación, así como varios meses o años después de la exposición (BLUS, 1996).

Uno de los principales efectos de estas concentraciones de DDT se dieron sobre la reproducción de las aves; sus huevos tenían unas cáscaras extraordinariamente finas y frágiles y muchos se rompían durante la incubación. De esta forma las poblaciones de algunas especies de aves disminuyeron de forma alarmante (BLUS, 1996).

Otro importante problema fue que muchos organismos desarrollaron resistencia y para luchar contra ellos había que emplear cantidades cada vez mayores del producto

y con menor eficacia. De ser un benefactor de la humanidad pasó a ser enemigo público entre los años 1970 y 80 llegando con ello su prohibición. Afortunadamente, su desuso coincidió con el desarrollo de nuevos insecticidas con características mucho menos peligrosas (BLUS, 1996).

Aun así, el DDT se sigue usando en muchas partes del mundo, principalmente en aquellos países en vías de desarrollo, por lo que la deposición atmosférica continúa siendo una fuente adicional sobre medio ambiente (IWATA *et al.*, 1993).

Los efectos de los compuestos organoclorados sobre organismos vivos se describen en el siguiente capítulo, *Contaminación y Consecuencias por Organoclorados*.

### 2.2.2. BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs)

Los primeros compuestos de PCB fueron sintetizados en 1864, pero su producción comercial no comenzó hasta finales de los años 20 (HAYES, 1982). Son sustancias pertenecientes al subgrupo de hidrocarburos clorados aromáticos, con fórmula general  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$  (Fig. 2.2). El número y posición de los átomos de cloro determina las propiedades biológicas y el comportamiento ambiental de cada uno de los bifenilos policlorados.

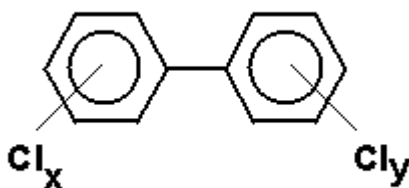


Fig. 2.2 Estructura química general de los bifenilos policlorados (PCBs)

Los PCBs incluyen un grupo de compuestos desde monoclorados a decaclorados con un núcleo bifenil. Hay 209 congéneres a causa de las 10 sustituciones posibles de un átomo de cloro o hidrógeno en la posición del núcleo, aunque debido a sus bajas concentraciones sólo menos de 100 de estos congéneres podrían tener importancia ambiental o toxicológica (HUTZINGER *et al.*, 1974; HANSEN, 1987). Los congéneres se dividen en tres clases: coplanar, mono-orto coplanar y no coplanar, según la posición de

los átomos de cloro en la molécula (DUFFY *et al.*, 2003). Presentan distintas características físico-químicas y diferentes actividades biológicas, lo que hace que puedan originar unas distribuciones ambientales y unas respuestas tóxicas muy complejas (SAFE, 1994). Las mezclas comerciales de PCB se identifican por sus nombres tradicionales, como Aroclor, Clophen, y Kaneclor, y un número que puede indicar el porcentaje de contenido en cloro respecto al peso. Son las que se usan con mayor profusión en la industria y las que representan un mayor peligro para el medioambiente (STACK *et al.*, 1999), debido a los fenómenos de sinergia con efecto de potenciación o de antagonismo que pueden presentar (SAFE, 1994). Estas mezclas pueden contener alrededor de 140 congéneres (SCHULTZ *et al.*, 1989). Los PCBs son insolubles en agua, químicamente estables, altamente aislantes, con el punto de ebullición a alta temperatura, y no inflamables (+170 °C). Se han producido de 2.2 a 3.3 millones de toneladas de PCBs debido a estas propiedades de gran aplicación en la industria, principalmente por la extrema resistencia a la ruptura química, la alta estabilidad térmica y la baja presión de evaporación, inflamación, y solubilidad (WHO, 1976; DE VOOGT AND BRINKMAN, 1989). Dichos factores contribuyen enormemente a la distribución ubicua en el ambiente atmosférico, terrestre y acuático, especialmente su gran resistencia a la ruptura química y biológica a través de procesos naturales. Esta resistencia inusual, más su tendencia a permanecer y acumularse en organismos vivos, genera la presencia de los PCBs en el ambiente y una amplia dispersión con sus consecuentes efectos (NIMI, 1996).

Las propiedades mencionadas resultaron en el uso general de estos compuestos en transformadores eléctricos, condensadores de alta y baja tensión, motores eléctricos refrigerados con líquidos, sistemas hidráulicos, turbinas de transmisión, plaguicidas y agroquímicos, plastificados, adhesivos, pinturas, electrodomésticos, etc. (WHO, 1976; DE VOOGT AND BRINKMAN, 1989).

La preocupación acerca de la presencia de PCBs en el ambiente comenzó alrededor de 1966 cuando investigaciones en Suecia revelaron la presencia de PCBs en muestras de suelo y aire que eran analizadas buscando DDT (JENSEN, 1966). Su producción y uso fue restringido en 1970 cuando se identificaron como sustancias químicas persistentes en la vida salvaje (JENSEN, 1972). Tales restricciones han derivado en una disminución en la concentración de PCBs en animales silvestres desde entonces, cuando de hallaron concentraciones por encima de los 100 mg/kg en peces de ecosistemas altamente contaminados (BROWN *et al.*, 1985).



Aunque la fabricación, el procesamiento, la distribución comercial y el uso de los PCBs fue prohibida en Estados Unidos en 1979, los PCBs permanecen presentes en el ecosistema. Desde 1930 hasta 1976 la producción mundial de estos compuestos se estimó en 1,3 billones de libras (DURFEE *et al.*, 1976). Las fuentes actuales proceden de la liberación de los compuestos que en su momento fueron absorbidos por el sedimento, la deposición atmosférica, las fugas de los viejos equipamientos, y los vertidos ilegales de viejos almacenes. Si sumamos a lo anterior las características específicas de los organoclorados, que los convierte en sustancias altamente estables, de baja degradación química en las condiciones ambientales y gran ubicuidad en el ambiente, obtenemos como resultado la presencia, aún en nuestros días, de elevados niveles de organoclorados en los organismos y en los ambientes que nos rodean (NIIMI, 1996). El grado de bioconcentración en el organismo depende del período y nivel de exposición y de la estructura química del compuesto, incluyendo la posición y el patrón de sustitución. Aquellos congéneres con mayor contenido en cloro y mayor coeficiente de lipofilia son más fácilmente bioacumulados (SAFE, 1994).

Muchos experimentos de laboratorio y otros estudios han intentado determinar los efectos que producen los PCBs en la salud de los seres humanos y otros seres vivos. Extensas revisiones hechas por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1987), el Programa Nacional de Toxicología (NTP, 1989), la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH, 1996), y la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA, 1996 a,b), han determinado que existe suficiente evidencia para considerar que los PCBs son cancerígenos en los animales. El contenido de cloro era anteriormente considerado como un factor importante en el grado de carcinogenicidad de particulares mezclas de PCBs. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la posición de los cloros en la molécula de PCB es también un determinante clave del potencial cancerígeno (BRUNNER *et al.*, 1996). Este tema será importante para las futuras evaluaciones de la EPA sobre respuesta a las dosis (EPA, 1996b).

En varios estudios sobre animales se han observado efectos sobre el hígado, los sistemas inmunológico, nervioso, y reproductivo, y otros sistemas orgánicos (WHO, 1976; ATSDR, 1996). La toxicidad sistémica ocurre más frecuentemente a partir de la ingestión que por la absorción a través de la piel o por la inhalación de vapores que contengan residuos del compuesto (KLEIMAN, 1997).

Los policlorobifenilos se encuentran entre los más comunes y más tóxicos de los hidrocarbonados clorados; su presencia en los ecosistemas marinos del Mediterráneo, especialmente en el Mar Adriático se encuentra ampliamente reflejado en la literatura (FOCARDI *et al.*, 1984, 1985, 1988; CÍCERO 1992; GIOURANOVITS-PSYLLIDOU *et al.*, 1994; CORSOLINI *et al.*, 1995; BORRELL *et al.*, 1996). La toxicidad de los congéneres planos con sustituciones de cloro en las posiciones *meta* y *para* es similar a la del 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-*p*-dioxina (TCDD), el compuesto más tóxico para los organismos confirmado por numerosos datos (TANABE *et al.*, 1987a; SAFE, 1990; SEEGAL *et al.*, 1991; KANNAN *et al.*, 1993c; CORSOLINI *et al.*, 1995). Estos congéneres de tipo coplanar presentan mayor afinidad por el receptor de hidrocarburos arílicos (AhR) y son relevantes desde el punto de vista de la inmunotoxicidad (SILKWORTH & GRABSTEIN, 1982). Los mono-orto-coplanares y no coplanares no se unen al receptor Ah y presentan un tipo de toxicidad distinta a la de las TCDD (KODAVANTI & TILSON, 1997). En un principio se pensaba que eran sólo los congéneres que tenían afinidad por el receptor Ah los responsables de la inmunotoxicidad, pero hoy se sabe que otros tipos de congéneres también pueden afectar al sistema inmune, si bien lo hacen con mecanismos de acción diferentes y afectando a distintos componentes y función del sistema inmune (SILKWORTH & GRABSTEIN, 1982; STACK *et al.*, 1999).

Como otros tóxicos lipofílicos, los policlorobifenilos alcanzan los tejidos grasos vía sanguínea y se acumulan hasta la movilización de las grasas, momento en el cual regresan a la circulación sanguínea hasta el final de la inanición. La repetición de ciclos de acumulación y movilización de las grasas puede causar riesgos a los organismos de ser contaminados por sustancias tóxicas lipofílicas como los organoclorados (BERNHOF & SKAARE, 1994).

Las sustancias xenobióticas que han sido ingeridas por el organismo seguirán una de las dos rutas bioquímicas según su solubilidad: los compuesto hidrosolubles como los degradables por sistemas de enzimas desintoxicantes (como las oxidasas de función mixtas, MFO) (PARKISON & SAFE, 1987) pueden ser eliminados por el sistema o ser convertidos en compuestos menos tóxicos que se almacenan en los tejidos; los hidrofóbicos son principalmente almacenados en los tejidos grasos. En ambos casos, una vez son movilizados junto a las grasas regresan a la circulación sanguínea alterando la fisiología normal del organismo. A este riesgo de disfunción de sus sistemas vitales hay que añadir la biomagnificación que se da en el ambiente (BERNHOF & SKAARE, 1994).

El metabolismo de los PCBs se realiza mediante el complejo enzimático citocromo p450 y comienza con la hidroxilación. Este proceso origina compuestos hidroxibifenilos, que siendo estrógenos más potentes *in vitro* que sus precursores, son capaces de producir un efecto uterotrópico (SOTO *et al.*, 1995).

Los PCBs se encuentran entre los contaminantes ambientales los que, aun a bajos niveles, ocasionan efectos adversos sobre los organismos tales como supresión inmunológica y teratogenicidad (BERGERON *et al.*, 1994). Existe cada vez una mayor evidencia de que algunos congéneres de PCBs son capaces de alterar la reproducción y función endocrina en peces, aves, y mamíferos, incluyendo al ser humano, particularmente durante el desarrollo (BISHOP *et al.*, 1991; GOLDMAN AND YAWETZ, 1991; SAXENA *et al.*, 1992). Investigaciones sobre el mecanismo a través del cual estos compuestos alteran la función reproductiva indican una actividad estrogénica causando alteraciones en la diferenciación sexual (BERGERON *et al.*, 1994).

Existen países donde aún se encuentran transformadores que contienen aceite refrigerante de PCB y que, en muchos casos, se libera por falta de mantenimiento. Esta liberación contamina el ambiente en el que se encuentra. Pero el principal riesgo ocurre si los transformadores explotan o se prenden fuego, en ese caso, el PCB se transforma en un producto químico conocido como dioxina. Las dioxinas se producen como consecuencia de la combustión de los bifenilos policlorados. Se denominan dioxinas tanto a las dibenzodioxinas policloradas (PCDD) como a los dibenzofuranos policlorados (PCDF). Son altamente dañinas y está comprobada su propiedad cancerígena (KLEIMAN, 1997).

En 1972, La Ley sobre Dictaminación y Fabricación de Sustancias Químicas prohibió en principio la producción, importación y utilización de los bifenilos policlorados.

En 1976, la OMS recomendó la prohibición de la fabricación, comercialización y uso de los PCBs a nivel mundial.

En 1978, la ONU recomendó la destrucción de los PCBs mediante su incineración a altas temperaturas.

Durante décadas la estabilidad extrema, la baja inflamabilidad y la baja conductividad de los PCBs les hizo el aislante líquido normal en los transformadores, y dado que éstos son un componente esencial de las redes de distribución de electricidad, la contaminación de PCBs es omnipresente. En los países industrializados, se fabricaron entre los años 20 y finales de los 70, actualmente se siguen fabricando en

muchos países en desarrollo. Los científicos estiman que el 70 % de todos los PCBs fabricados todavía están en uso o en el medio ambiente y que sus efectos se extenderán hasta después del año 2025 (NIIMI, 1996).

### 2.2.3. CONTAMINACIÓN Y CONSECUENCIAS POR ORGANOCLORADOS

Aunque la fabricación de los PCBs y del DDT se ha restringido desde 1970, el medio marino continúa recibiendo la entrada de estos compuestos de la liberación de los compuestos absorbidos por los sedimentos. Existen otras fuentes de PCBs que incluyen la deposición atmosférica, fugas de viejos equipamientos, y ocasionales descargas ilegales de viejos almacenes (BORLAKOGLU & HAEGELE, 1991). Por otro lado, y a pesar de las restricciones, el DDT se sigue usando en determinadas partes del mundo, por lo que la deposición atmosférica puede ser una fuente adicional de este contaminante en el medio marino (IWATA *et al.*, 1993). El transporte atmosférico de los contaminantes es reconocido actualmente como la vía más importante para su dispersión (TAKEOKA *et al.*, 1991) y es la primera fuente de contaminación en las regiones polares y en los ambientes oceánicos (ONO *et al.*, 1987; BACON *et al.*, 1992). Fuentes de monitorización sobre la distribución de algunos organoclorados (HCHs, DDTs y PCBs) muestran que hasta principios de los 80 los mayores niveles oceánicos se encontraban en el hemisferio norte (TANABE *et al.*, 1994). Sin embargo, debido a que muchas naciones desarrolladas han prohibido la producción y uso de muchos de estos organoclorados mientras que muchos países tropicales han continuado usándolos, los niveles son ahora mayores en los trópicos (TANABE *et al.*, 1994). El hecho de que grandes cantidades de algunos organoclorados pueden ser dispersadas a través de la atmósfera implica que los organoclorados usados en una parte del mundo pueden llegar a distribuirse de manera global. Además de persistir en el medio ambiente algunos son resistentes al metabolismo, y muchos son extremadamente lipofílicos, por lo que una vez ingeridos se acumulan en las reservas de grasa hipodérmica y visceral de los organismos que a ellos se exponen. Entre los lípidos de estos tejidos, existe una mayor tendencia a acumularse en lípidos neutros como los triglicéridos (BOER, 1988; KAMMANN *et al.*, 1990). Aunque los organismos con altos contenidos en lípidos pueden bioconcentrar grandes cantidades de estos químicos, los almacenes grasos pueden actuar como una reserva protectora contra los efectos tóxicos (GEYER *et al.*, 1994). La exposición a los hidrocarburos

clorados puede contribuir a la disminución del éxito reproductivo en una variedad de organismos, incluyendo peces (SMITH & COLE, 1973; SPIES & RICE, 1988), reptiles (BISHOP *et al.*, 1991), aves (ROYLANCE *et al.*, 1985; HENNY & HERRON, 1989; KUBIAK *et al.*, 1989), y mamíferos marinos (MARTINEAU *et al.*, 1987; SUBRAMANIAN *et al.*, 1987). Esto se debe a las propiedades estrogénicas que tienen los organoclorados (BERGERON *et al.*, 1994; ARNOLD *et al.*, 1997). Por otro lado, la exposición a los organoclorados se ha ligado también a la inmunosupresión (ANDERSON, 1989; SAXENA *et al.*, 1992).

Los organoclorados más frecuentemente detallados en los tejidos biológicos, como los PCBs, DDT/DDE, dioxinas, dieldrín, aldrín, clordano, lindano, no son considerados generalmente como carcinógenos a las concentraciones ambientales detectadas. Sin embargo, estas sustancias son tóxicas a concentraciones extremadamente bajas cuando están presentes tras la gestación en los estados postnatales y de desarrollo de las crías, afectando a la formación y buen funcionamiento de los sistemas endocrinos, reproductivos, inmunológicos y nerviosos. Estos químicos interfieren con mensajeros químicos endógenos como las hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, y sustancias inhibitorias, afectando el desarrollo directo, el control de la regulación homeostática y la función de estos sistemas (COLBORN *et al.*, 1993). Los embriones, fetos, y recién nacidos son especialmente vulnerables a las más bajas concentraciones de hormonas maternas y a los químicos que con éstas interfieren; en la mayoría de los casos, se retrasa el desarrollo y la organización del organismo, siendo sus efectos irreversibles (MORI & NAGASAWA 1988; BERN 1992; VOM SAAL *et al.*, 1992; GUILLETTE *et al.*, 1995).

En un esfuerzo por aportar más significado a los datos de concentración de los diferentes productos químicos, se han desarrollado técnicas para definir los cambios funcionales que ocurren en los sistemas fisiológicos y bioquímicos que acompañan a la presencia de sustancias tóxicas en el organismo. Mediante la comparación de los resultados cuantitativos de concentración con las respuestas bioquímicas observadas, la importancia biológica ante la presencia de compuestos tóxicos comienza a tener significado. En los últimos años, esta técnica ha sido aplicada en los estudios de investigación sobre la vida silvestre, analizando el nivel de actividad enzimática ante la presencia de diferentes organoclorados, tales como las dioxinas, furanos, DDT, y ciertos congéneres de PCBs (MCFARLAND & CLARKE, 1989).

En el caso del DDT, su presencia se ha relacionado con alteraciones observadas en el transporte activo celular. Fueron MATSUMURA *et al.*, (1969), uno de los primeros

en realizar estudios de este tipo. Sus resultados indicaban que el transporte de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{++}$  dependiente de la ATPasa en células neuronales de ratas era específicamente sensible a la presencia de DDT, sugiriendo que el DDT está relacionado directamente con la disfunción del mecanismo de transporte iónico en el sistema nervioso *in vivo*. En 1971, JANICKI & KINTER, obtuvieron resultados, según los cuales, concentraciones de DDT en torno a 1-10 ppm *in vitro*, causaban un 40 % de inhibición en la enzima ATPasa. *In vivo*, se vio cómo tras largas exposiciones a compuestos organoclorados, el transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{++}$  dependientes de la ATPasa fue inhibido en especies diferentes de peces (KOCH *et al.*, 1972). Estas observaciones fueron nuevamente corroboradas por PHILLIPS & WELLS (1974) en un estudio *in vitro* llevado a cabo sobre cinco especies diferentes de tortugas dulceacuícolas.

Los congéneres de PCBs con sustituciones de cloro non-, mono-, o di-orto, es decir los bifenilos: 60, 77, 105, 126, 137, 138, 153, 156, 169, 170, 180 y 194 tienen una configuración plana que facilita la unión al receptor de hidrocarburos arílicos (Ah), receptor que presenta una fuerte afinidad con la dioxina, lo que ha originado que dichos congéneres sean caracterizados como dioxinas por tener un potencial tóxico similar a éstas y a los compuestos furanos. Esta afinidad de las dioxinas con el Ah y la consecuente activación del sistema citocromo P450 en células hepáticas de ratas se ha establecido como estándar para la comparación y determinación de la toxicidad de los diferentes congéneres (COLBORN & SMOLEN, 1996).

A partir del Factor de Equivalencia Tóxica (FET) determinado por SAFE (1990) para los PCBs planos, la suma de la actividad de los congéneres puede ser definida en términos de Equivalentes Tóxicos de Dioxina (EQTs). La inducción por dioxinas de la actividad enzimática del Ah se ha asociado con atrofia del timo (supresión de las células T), pérdida de peso, porfiria, y para el caso específico de ratones, hendidura del paladar (SAFE 1987, 1990). Tanto la dioxina como algunos congéneres planos de PCBs disminuyen los niveles de las hormonas masculinas (HAAKE *et al.*, 1987), de las hormonas tiroideas, y de la insulina, afectando por tanto a los sistemas endocrino e inmunológico (KEYS *et al.*, 1985; BIRNBAUM, 1994).

Los congéneres planos similares a las dioxinas se definen por ser compuestos con un valor de factor de equivalencia tóxica (TEF) distinto al cero, según el proceso de cálculo de equivalencia tóxica NATO/EPA establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) en 1989. Los síntomas tóxicos característicos

de estos compuestos coinciden con los anteriormente descritos para las dioxinas como agentes inductores de la actividad enzimática del Ah e incluyen: pérdida de peso, atrofia del timo, edema subcutáneo, supresión inmunológica, alteración hormonal, carcinogenicidad, y efectos reproductivos de fetotoxicidad y teratogénesis (TILLET *et al.*, 1991). El congénere 118, catalogado como similar a las dioxinas, destaca por su elevado potencial inductor de enzimas y un elevado potencial de toxicidad (MCFARLAND & CLARKE, 1989).

En un estudio sobre la comparación de la toxicidad entre los congéneres de PCBs, se inyectaron congéneres en huevos de pollos con un estadio temprano de desarrollo (cuatro días de incubación), resultando que el congénere 126 fue el más tóxico y el más potente inductor de la oxidasa de función mixta en el hígado de los embriones de pollos (BRUNSTROM & ORBERG, 1982).

Otros congéneres de PCBs frecuentemente detectados, como los 138, 153, y 180 tienen una menor toxicidad que los categorizados como similares a las dioxinas (SAFE, 1990). MCFARLAND & CLARKE (1989), sin embargo, consideran estos mismos congéneres como entre los 36 congéneres más importantes para el medio ambiente, por su prevalente potencial tóxico y la relativa abundancia de éstos en el tejido animal. Los mismos autores categorizaron los congéneres 118 y 138 como los principales causantes de efectos biológicos adversos basándose en su capacidad para inducir el sistema de la oxidasa de función mixta. STORELLI & MARCOTRIGIANO (2000) detectaron el congénere 153 en mayor porcentaje (37-40 %), seguido por el 138 (31-35 %), el 180 (16-21 %), y el 118 (4-6 %) en el hígado, riñón, pulmón, corazón y tejido muscular en tortugas marinas *Caretta caretta*.

Los congéneres 105 y 167 detectados por BRYAN *et al.* (1987) causaron más del 99 % de la toxicidad total en huevos de tortugas mordedoras, y concluyeron que las grandes reservas de grasa de los huevos no parecen impedir que dichos congéneres sean dispersados entre los componentes bajos en grasa del huevo.

Las concentraciones de los congéneres de manera individual reflejan la solubilidad de las lipoproteínas (BRYAN *et al.*, 1987). Los tetracloro bifenilos resultaron los homólogos más concentrados seguidos por los pentacloro bifenilos, mientras que los octacloro bifenilos, los nonacloro bifenilos y los decacloro bifenilos se detectaron en menor concentración en huevos de tortugas bobas (ALAM & BRIM, 2000). Los dicloro y tricloro bifenilos se detectaron en niveles muy bajos, lo que sugiere una migración preferente de los congéneres con bajos números de átomos de cloro, quizás debido a la

permeabilidad de las membranas a los congéneres de PCBs con bajo número de átomos de cloro. Los PCBs con bajo contenido en cloro son solubles en agua y fácilmente transportados a través de las membranas (COBB & WOOD, 1997).

La muerte por compuestos organoclorados se produce por acción directa sobre el sistema nervioso. El diagnóstico de muertes basadas en residuos de concentraciones en los tejidos es preciso sólo en el caso del cerebro (STICKEL, 1973; CLARK, 1981). Este diagnóstico varía con las especies, pero siempre dentro del mismo orden de magnitud. Para el DDT, las concentraciones residuales diagnosticadas en cerebros de mamíferos se encuentran sobre los 45 ppm en ratas de laboratorio (DALE *et al.*, 1963; HAYES, 1965; HENDERSON & WOOLLEY, 1969; CLARK, 1981) y 50 ppm en ratones de laboratorio (GINGELL & WALLCAVE, 1974). Las concentraciones mencionadas son similares a las detectadas en aves (STICKEL, 1973). Las concentraciones letales en cerebro de PCBs sólo se conocen para la especie murcielaguito moreno (*Myotis lucifugus*), siendo de 1400 ppm (CLARK & STAFFORD, 1981) y para cuatro especies de aves, a concentraciones superiores a los 310 ppm (STICKEL *et al.*, 1984b). Sin embargo, muy altos niveles de PCBs en la dieta pueden también matar de un modo no neurotóxico, en tal caso las concentraciones en cerebro pueden ser no detectadas (STICKEL, 1975).

Debido a la gran cantidad de indicadores químicos que se encuentran entre las células de los sistemas en desarrollo, existen numerosos objetivos sobre los cuales los contaminantes pueden actuar como mensajeros químicos, siendo por tanto muy difícil detectar los pequeños efectos que ocasionan y prácticamente imposible predecir las lesiones o modificaciones que se dan en el desarrollo. Por ejemplo, muchos efectos pueden no aparecer realmente en el momento del nacimiento o durante el crecimiento pero pueden manifestarse subsecuentemente como una función disminuida que conduce a la pérdida de la competencia inmune, a un desarrollo sexual anormal, a un mal funcionamiento del sistema reproductivo y nervioso, y a cambios en el comportamiento (COLBORN *et al.*, 1993). Así que puede haber un largo retraso entre la exposición y los efectos ocasionados, por lo que estos últimos pueden no expresarse hasta la madurez del individuo.

Como consecuencia de este carácter insidioso, los efectos pueden no ser reconocidos hasta llegar a la madurez y resultar en cambios de los niveles poblacionales. Dentro de una población, la muerte de un animal es generalmente pasada por alto, y hasta que no se ven afectados un número importante de individuos no se considera un problema reconocido (CONSENSUS STATEMENT 1995). Reconocer estos



efectos retardados en especies de larga vida y lento desarrollo como tortugas, ballenas y humanos, resulta aun más difícil (COLBORN & SMOLEN, 1996).

#### **2.2.4. INTOXICACIÓN POR ORGANOCORADOS EN SERES HUMANOS**

La estructura cíclica y su gran peso molecular hace a los organoclorados muy parecidos químicamente a los compuestos hidrocarburos clorados utilizados como disolventes. Pero los insecticidas organoclorados se diferencian de los hidrocarburos clorados en que los primeros son estimulantes del sistema nervioso central y los segundos son depresores del mismo. En realidad esta distinción no es absoluta, el gamma isómero del hexaclorobenceno (Lindano) es un estimulante, pero hay otros isómeros que tienen un efecto opuesto (COLBORN *et al.*, 1993). En 1948 se descubrió que el DDT se acumulaba indefinidamente en tejidos humanos, y en 1970 varios estudios revelaron su detección en la población general de Estados Unidos; posteriormente se comprobó que esto también sucedía con otros insecticidas como hexaclorobenceno, diclorodifenildietano, heptaclor, aldrín y dieldrín (HAYES, 1982). El Instituto Nacional del Cáncer en USA relacionó el heptaclor con tumores malignos en ratas (ARENA, 1970). En 1972 fue prohibido el DDT en Estados Unidos, posteriormente lo fueron también el heptaclor, kepone, mirex, endrín, aldrín, dieldrín, hexaclorobenceno, strobane, clorobencilato y clordano. El uso de toxafeno está muy restringido, estando disponibles el metoxiclor, keltane y lindano. Posteriormente al demostrarse su persistencia en el medio, su acumulación en seres vivos y otros posibles efectos nocivos a largo plazo, se prohibió su uso en la mayoría de los países (KLEIMAN, 1997).

El menor número de intoxicaciones en la actualidad se debe a su menor uso, al ser desplazado por otros insecticidas de similar eficacia pero que son biodegradables y no persisten en el medio ambiente. El más usado en la actualidad es el lindano que se usa contra garrapatas y piojos en champús y soluciones antiparasitarias (KLEIMAN, 1997).

#### **Efectos sobre la salud**

Cloroacné y neuropatías periféricas han sido efectos asociados con exposiciones de corta duración a los PCB, principalmente a los productos de su degradación

(KLEIMAN, 1997). Como efectos crónicos se han estudiado principalmente el desarrollo del cáncer junto a otros efectos relacionados con la reproducción y la disrupción endocrina (FALCK *et al.* , 1992; KRISHNAN & SAFE, 1993).

La exposición a compuestos organoclorados durante los períodos prenatales afectan más a la fertilidad del individuo que cualquier otra etapa de la vida (SHARPE & SKAKKEBAEK, 1993). Es durante este período cuando se forman los tejidos que formarán parte del sistema reproductivo adulto, como las células de Sertoli, responsables de la espermatogénesis. Recientemente, se ha descubierto que no sólo ha disminuido en un 50 % la cantidad de espermatozoides en el hombre respecto a los últimos 50 años, sino que además, la calidad y la movilidad de los espermatozoides también ha disminuido de manera significativa (CARLSEN *et al.*, 1992; AUGER *et al.*, 1994).

La posición que ocupa la madre en la cadena trófica unida a la involuntaria exposición a los organoclorados, ha llevado a ocasionar afecciones en el desarrollo cognitivo y motor de sus descendientes (JACOBSON & JACOBSON, 1993). Así, se observó cómo el cordón umbilical de las madres expuestas al menos durante seis años a los contaminantes del Lago Michigan por la ingesta de pescado, presentaban concentraciones mayores que mujeres de la misma comunidad que no habían consumido pescado (JACOBSON *et al.*, 1990a). Aun siendo niveles muy bajos, las concentraciones detectadas en el cordón umbilical se asociaron con períodos gestacionales cortos, bajo peso en los recién nacidos y medidas de circunferencias cefálicas inferiores a la media (JACOBSON & JACOBSON, 1993).

En otros estudios realizados sobre exposición prenatal a los PCBs se observó déficit motriz al nacimiento (ROGAN *et al.*, 1986; GLADEN & ROGAN, 1991), déficit en habilidad motora al final del primer año (GLADEN *et al.* , 1988), deterioro de la memoria de reconocimiento visual a los siete meses de edad (JACOBSON *et al.*, 1985), y calificaciones psicomotoras sustancialmente menores en la Escala de Bayley de Desarrollo Infantil, a los 18 y 24 meses, como también déficit en memoria a corto plazo a los cuatro años de edad. Otros estudios indicaban que algunos déficit observados en edades tempranas no eran aparentes en las edades de 2, 4 ó 5 años (GLADEN & ROGAN, 1991).

Según RONCEVIC *et al.* (1987), los efectos en los niños no dependen exclusivamente de la exposición a los organoclorados de la madre durante el embarazo, sino que también influye la exposición de la madre previa a la concepción.

Los organoclorados se han estudiado como tóxicos que actúan como disruptores hormonales que pueden conducir a la infertilidad, al desarrollo de tumores de mama, próstata, testículos, ovarios y útero, y a otros desórdenes hormonales (COLBORN *et al.*, 1993). Otros estudios no consideran a los PCBs como estrogénicos, pero sí que sus metabolitos tienen una débil actividad estrogénica (SAFE, 1995). Se cree que mezclas de PCBs pueden exhibir actividad tanto estrogénica como antiestrogénica. SAFE (1995) ha estimado que la actividad estrogénica en la dieta promedio es unas 40 millones de veces más elevada que la de los estrógenos ambientales. En otra revisión realizada por KEY & REEVES (1994) no se encontraron diferencias en los niveles corporales de PCBs y DDT entre pacientes con cáncer y los libres de cáncer del grupo de control. AHLBORG *et al.*, (1995) tampoco apoyan la hipótesis de que el DDT o los PCBs puedan causar un aumento del riesgo de cáncer.

La complejidad de las mezclas de PCB y sus productos de degradación térmica han hecho a este grupo de sustancias químicas, junto a los DDT y sus metabolitos, difíciles de caracterizar en términos de toxicidad. Es importante reconocer que la toxicidad de las mezclas de PCBs depende de la toxicidad de los congéneres individuales presentes en las diferentes mezclas y, por supuesto, de la presencia de otros contaminantes que pueden interactuar y agravar sus efectos (DEVOOGT & BRINKMAN, 1989; SAFE, 1994).

### **Mecanismos de intoxicación**

La mayoría de las intoxicaciones se producen en zonas rurales. La intoxicación puede ser a través de la vía digestiva de forma accidental o con fines suicidas, o a través de la vía cutánea en relación con fumigaciones en actividades agrícolas sin guardar las medidas de seguridad. Otros mecanismos incluyen el mal uso o reciclado de envases y el no respetar los plazos entre tratamiento y recolección de la cosecha de vegetales tratados. Otras veces hay intoxicaciones masivas por contaminación de alimentos al transportarse o guardarse junto a algunos de estos productos. Ha habido contaminación en fabricas de producción de estas sustancias. También se ha descrito contaminación por el empleo de lindano para tratar diversos parásitos (KLEIMAN, 1997).

La exposición a largo plazo de estos productos a través de la vía inhalatoria y cutánea origina efectos crónicos tóxicos en trabajadores en contacto con estos compuestos.

### **Características fisicoquímicas y toxicocinética**

La mayor parte de los efectos asociados con la exposición a químicos tienen un umbral específico de exposición, es decir, una dosis por debajo de la cual no ocurren efectos adversos. La EPA se basa en este concepto para establecer “*dosis de referencias*” (RfDs), dosis a las que hasta los miembros más sensibles de la población pueden ser expuestos durante un período de vida completo (72 años) sin observarse efectos adversos sobre su salud. La EPA ha establecido RfDs para dos mezclas específicas de PCB: Aroclor 1254, 0.02 microgramos/ kg peso corporal por día, y Aroclor 1016, 0.07 microgramos/kg/día (EPA, 1996a).

La dieta es una de las principales fuente de intoxicación. Su elevada resistencia a degradarse y su carácter lipofílico facilita la bioacumulación y consecuente biomagnificación de los organoclorados a través de las cadenas tróficas. Como resultado grandes concentraciones de estos químicos persistentes se encuentran de forma general en aquellos animales que como el hombre, ocupan las más altas posiciones tróficas. Por ello la FDA ha establecido límites de tolerancia en los alimentos para poder ser vendidos al público sin que supongan un riesgo para la salud de los consumidores. Algunos de ellos actualmente en vigencia:

- 2 ppm en filetes de pescado (FDA, 1988)
- 1.5 ppm en grasa de la leche (Fed. Reg., 1979)
- 1.5 ppm en la porción de grasa de productos lácteos manufacturados (Fed. Reg., 1979)
- 3 ppm en aves de corral (Fed. Reg., 1979)
- 0.3 ppm en huevos (Fed. Reg., 1979)

Los niveles medidos en la mayoría de los productos mencionados están muy por debajo de las tolerancias permitidas. Existe también una Base de Datos de Consumo Nacional de Pescado para mantener a los consumidores informados de los niveles de contaminación monitorizados en peces (FDA, 1988; NOWELL & RESCK, 1994).

Según estudios de la FDA la cantidad de PCB consumida en la dieta ha disminuido de manera sostenida (de casi 7 mg/día en 1971 a menos de 0.1 mg/día en 1988) (SHANK, 1991), y la fuente primaria ha cambiado de pescados a la carne (ATSDR, 1996).

Los organoclorados en preparaciones acuosas se absorben mal, en cambio en disolventes orgánicos mejora mucho su absorción. Desde el intestino pasa a la vena porta y llega al hígado donde sufre metabolización que varía según la sustancia. Así el lindano origina diversos metabolitos que se eliminan por vía renal en forma de conjugados glucurónicos y sulfúricos, y fenoles libres. Son potentes inductores enzimáticos del sistema microsomal hepatocitario. Experimentan un ciclo enterohepático, excretándose por la leche y las heces. Por el riñón se excretan los metabolitos hidrosolubles (ENGST *et al.*, 1979).

El DDT y sus metabolitos son los que se acumulan más en los tejidos. Las vidas medias de eliminación son prolongadas llegando a semanas o varios meses (SHANK, 1991).

### **Fisiopatología**

Estos compuestos debido a su lipofilia se acumulan en el tejido adiposo y actúan sobre el sistema nervioso central sobre el que producen un aumento de la excitabilidad de la membrana celular, lo que facilita la transmisión del impulso nervioso. Aunque esta característica toxicológica de estimulación del sistema nervioso es la general entre los plaguicidas organoclorados, se ha demostrado que algunos de ellos pueden producir un efecto antagónico. El DDT y sus derivados actúan sobre el axón nervioso alterando el transporte de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> forzando la apertura del canal de Na<sup>+</sup> por inhibición de la calmodulina y las ATPasas. Mientras que el mecanismo de acción para los ciclodienos, HCB y HCH se produce mediante la interferencia de los receptores GABA (ácido y aminobutírico) (NARAHASHI, 1987).

## 2.3 ORGANOCLORADOS EN ANIMALES ACUÁTICOS

Existen numerosos estudios realizados sobre la presencia de organoclorados en organismos acuáticos de vida libre. El principal grupo de organoclorados detectado en la mayoría de ellos es el grupo de los PCBs. La mayor importancia de los PCBs respecto a los DDTs no reside sólo en su mayor frecuencia sino también en los mayores niveles detectados en la gran variedad de organismos analizados (COLBORN & SMOLEN, 1996).

### 2.3.1. PCBs EN ANIMALES ACUÁTICOS

Las concentraciones de PCBs en el agua se deben a la proximidad de la fuente de contaminación, pero ello puede verse influido por factores diversos. Los PCBs son compuestos hidrofóbicos con coeficientes de reparto octano-agua de partición del agua ( $K_{ow}$ ) en el rango de  $\log$  4.40 para el monoclora a  $\log$  8.18 para el decaclorobifenilo (RAPAPORT & EISENREICH, 1984; HAWKER & CONNELL, 1988). El rango de solubilidad en agua va de los 1 a 5 mg/l para el monoclorobifenilo a cantidades en torno a los  $\mu\text{g/l}$  o menores para los congéneres altamente clorados (OPPERHUIZEN *et al.*, 1988; PATIL, 1991). Con estos rangos de solubilidad, es muy poco probable que puedan ser

encontrados en la columna de agua aun en sistemas altamente contaminados. Debido a este carácter hidrofóbico de los PCBs, existe una mayor tendencia de éstos a adsorberse a materiales como sedimentos o la biota del lugar (HIRAIZUMI *et al.*, 1979; LARSSON *et al.*, 1992).

La concentración de PCBs en ecosistemas acuáticos sin fuente de contaminación aparente es generalmente del rango de ng/l para aguas dulces y costas, y µg/l en aguas abiertas oceánicas (NIIMI, 1996). El transporte atmosférico es probablemente la fuente principal para aguas abiertas alejadas de la costa (ATLAS *et al.*, 1986; BIDDLEMAN *et al.*, 1989). El flujo de PCBs entre los ambientes acuáticos y atmosféricos es un proceso dinámico en el que los sistemas contaminados liberan mayor concentración de PCB a través de la volatilización que por deposición aérea (LARSONN *et al.*, 1990; ACHMAN *et al.*, 1993). Las mayores concentraciones de PCB se encuentran frecuentemente en sedimentos de ríos y estuarios, donde los niveles pueden alcanzar cifras superiores a los 10 mg/Kg. En sistemas marinos cercanos a fuentes importantes de contaminación las cifras varían en torno a los ng/l o inferiores debido a que ellos se asocian generalmente a aguas costeras donde la dilución es más rápida y eficaz (NIIMI, 1996).

En organismos acuáticos la concentración referida puede variar en torno a un factor de  $10^5$ , dependiendo de la especie y del lugar de la muestra (NIIMI, 1996). La concentración de PCB en plancton procedente de aguas relativamente no contaminadas se encuentra en el rango de los µg/kg, mientras que en el caso de aguas contaminadas se eleva sobre un factor de 10 (KAWANO *et al.*, 1986; OLIVER & NIIMI, 1988). Diferencias similares se dan en el caso de grandes invertebrados que habitan en aguas contaminadas respecto a aquellos que viven en ambientes libres de contaminación (RAMESH *et al.*, 1990; O'CONNOR, 1991). Las mayores diferencias en concentraciones de PCB se encuentran en peces carnívoros situados en los altos niveles de la cadena trófica, donde se aprecian concentraciones en el rango de los µg/kg en el caso de aguas no contaminadas frente a concentraciones de mg/kg en sistemas de mayor contaminación (NIIMI & OLIVER, 1989a; MUIR *et al.*, 1992). Estas mayores concentraciones en organismos de los altos niveles tróficos son atribuibles al efecto de la bioacumulación. Estudios de laboratorio han demostrado factores de bioconcentración en peces que pueden superar la cantidad de  $\log 5.35$  para diversos Arocloros (NEBEKER *et al.*, 1974; DE FOE *et al.*, 1978). Los modelos dinámicos de contaminación y el examen dinámico de la distribución de los congéneres de PCB en el agua y en los organismos de los

diferentes niveles tróficos indican que la dieta es el factor de mayor importancia (THOMANN, 1981; OLIVER & NIIMI, 1988).

### **Evaluación sobre los efectos causados en animales acuáticos**

El aumento en el uso de productos químicos halogenados desde 1940 y el aumento de la frecuencia de patologías y anomalías descrito en animales salvajes constituyen importantes evidencias circunstanciales para creer en una etiología con base química (NIIMI, 1996). Los efectos de algunos pesticidas organoclorados en la fisiología reproductora de aves rapaces han sido demostrados a través de una serie de estudios de laboratorio y de campo (COOKE, 1973). En el caso de los organismos acuáticos es actualmente menos evidente, debido a que la mayoría de los estudios se basan en correlaciones estadísticas entre la frecuencia de las anomalías y la concentración química encontrada, y no en relaciones causa-efecto (NIIMI, 1996).

Un organismo que se expone a un producto químico de tales características y cuyos niveles supera un determinado umbral patológico o tóxico puede responder a través de una serie de síntomas generales, además de otras perturbaciones biológicas y físicas. La respuesta podría ser directa y resultar en la muerte del organismo, o podría ser más discreta, tal como una disfunción bioquímica que pueda inhibir la reproducción y verse con ello la especie amenazada (NIIMI, 1990). Establecer qué perturbación fue la responsable resulta a veces demasiado complicado porque cada una tiene la capacidad de causar tales efectos. El papel de otros vectores en ocasiones no suele ser considerado en estudios de campo y descartarlos puede no ser una tarea fácil en determinadas circunstancias, ya que pueden inducir la misma o similar anomalía no siendo su etiología de origen químico (MIX, 1986; WATERMANN & KRANZ, 1992). Índices asociados con una calidad pobre del agua, tales como una temperatura elevada y baja concentración de oxígeno, pueden ser la causa de una ausencia de biota en un sistema afectado por contaminación química. Estos factores físicos pueden reducir la fuente de alimento disponible a los peces y aumentar la incidencia de enfermedades en aguas donde los productos químicos también están presentes (MÖLLER, 1990). Por consiguiente, no pueden ignorarse otros factores limitantes asociados con un ambiente contaminado químicamente (NIIMI, 1996).

Los efectos de los PCBs en los niveles detectados en organismos acuáticos podrían ser difícilmente evaluados de una manera directa debido a una serie de factores. No existen síntomas clínicos específicos que sean asociados con una intoxicación



inducida por PCBs en animales acuáticos. Otros productos químicos orgánicos e inorgánicos, naturales y/o antropogénicos se encuentran invariablemente presentes en los organismos y su hábitat. La presencia de estos otros agentes químicos es un factor importante que suele ser reconocido pero no tratado eficazmente, porque sólo unos pocos de éstos son controlados en los estudios de campo. Cuando un producto químico específico se detecta, intentar concretar su papel no resulta fácil a causa de dichas interacciones (NIIMI 1996). Estudios con mamíferos muestran que los PCBs y la 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-*p*-dioxina pueden actuar de manera sinérgica y antagónica (BANNISTER & SAFE, 1987; BANNISTER *et al.*, 1987). Otros casos similares ilustran las dificultades que resultan al proponer un examen de relaciones causa-efecto para un determinado compuesto en el ambiente natural debido a la presencia de otros productos químicos (NIIMI, 1996).

Gran número de estudios realizados con muestras de campo indican aumento de la mortalidad, anomalías patológicas, y cambios bioquímicos en organismos acuáticos procedentes de ecosistemas donde se han determinado las concentraciones de PCBs (NIIMI, 1996). Tales observaciones incluyen baja supervivencia de huevos y larvas procedentes de organismos salvajes y criados en laboratorio (STAUFFER, 1979; MONOD, 1985). La mayoría de las anomalías histológicas reflejan atresia ovárica y lesiones hepatocelulares (CROSS & HOSE, 1988; GARDNER *et al.*, 1989; MCCAIN *et al.*, 1992). Otras observaciones incluyen aumento de la actividad de la enzima oxidasa y cambios estructurales a nivel celular (KÖHLER, 1990; GALGANI *et al.*, 1991). Algunos efectos como la mortalidad en las primeras etapas de la vida, son claramente deletéreos; otros, tales como la presencia de lesiones neoplásicas, podrían considerarse deletéreos también; mientras que efectos como los cambios celulares y las variaciones en los niveles bioquímicos fisiológicos podrían resultar más difíciles de evaluar (NIIMI, 1996).

Los PCBs se encuentran en organismos acuáticos en concentraciones que podrían exceder los 2 mg/kg (2000 ppb), que resultan ser los niveles establecidos para peces y productos relacionados con el consumo por la *Agencia Reguladora de Canadá y Estados Unidos para la Protección de la Salud Humana*. Se podría utilizar esta información para evaluar las implicaciones toxicológicas de estos niveles de concentración en mamíferos, pero se sabe poco aún sobre estos animales acuáticos. Se han publicado interesantes compilaciones que han reunido todas las observaciones realizadas acerca de la relación entre la salud y los niveles de productos organoclorados en la vida acuática, pero las implicaciones toxicológicas de tales observaciones resultan

especulativas debido a la presencia, como ya se ha mencionado, de otros compuestos y factores influyentes (GILBERTSON, 1989). No obstante se puede confirmar la importancia toxicológica de los PCBs en organismos acuáticos comparando su concentración en organismos procedentes del medio natural con los estudios realizados en laboratorio sobre toxicidad y efectos crónicos de los PCBs en organismos similares. Se han realizado medidas de PCBs en agua y organismos acuáticos para indicar el rango de concentración en ecosistemas marinos y de aguas dulces relativamente contaminadas o no contaminadas. Algunos valores son antiguos y no son representativos de los niveles actuales; sin embargo ofrecen datos retrospectivos de la concentración de PCBs en ecosistemas altamente contaminados. Estos resultados se comparan con los obtenidos en estudios a corto plazo sobre toxicidad aguda y respuestas de comportamiento que se concluyen en pocos días a partir de estudios a largo plazo que estudian los efectos crónicos. Las investigaciones a largo plazo examinan el total de las respuestas de los organismos así como los efectos sobre el crecimiento y reproducción, incluyendo además aquellas probables respuestas producidas a escala celular y bioquímica. Los estudios de laboratorio sólo pueden concretar el nivel umbral o, lo que es lo mismo, el valor de la concentración corporal de residuos a la cual se manifiestan los efectos adversos. Ambos resultados se utilizan conjuntamente con objeto de evaluar la importancia toxicológica de la concentración de PCB que se detecta en organismos salvajes (NIIMI 1996).

### **Estudios de laboratorio sobre PCBs**

Los trabajos realizados sobre organismos acuáticos indican que los PCBs causan efectos adversos a concentraciones de  $\mu\text{g/l}$  en agua y  $\text{mg/kg}$  en tejidos (NIIMI, 1996). Los estudios sobre dosis letales en zooplancton indican que concentraciones superiores a  $10 \mu\text{g/l}$  producen la muerte de estos organismos en pocos días (NEBEKER & PUGLISI, 1974; BRANSON, 1977). En el caso de invertebrados mayores, tales como ostras y camarones, se da una mayor tolerancia a los PCBs siendo la concentración necesaria para causar la muerte de éstos superior a los  $10 \mu\text{g/l}$  en agua y a los  $25 \text{ mg/kg}$  ( $25000 \text{ ppb}$ ) en tejidos (DUKE *et al.*, 1970; NIMMO *et al.*, 1974). Los estudios en peces indican que concentraciones superiores a los  $10 \mu\text{g/l}$  causan la muerte en pocos días mientras que concentraciones superiores a  $1 \mu\text{g/l}$  resultan letales tras varios días de exposición en determinados peces de agua dulce (NEBEKER & PUGLISI, 1974; DE FOE *et al.*, 1978). Los estudios a largo plazo con presencia de PCBs en agua y en dieta sobre diversas

especies indican letalidad a niveles superiores a los 100 mg/kg (100000 ppb) en peces juveniles y superiores a los 250 mg/kg (250000 ppb) en adultos (HATTULA & KARLOG, 1972; MAYER *et al.*, 1977; MAUCK *et al.*, 1978).

Algunas actividades relacionadas con el crecimiento en fitoplancton, tales como división celular y fotosíntesis, pueden verse reducidas por concentraciones inferiores a 10 µg/l de PCBs (KEIL *et al.*, 1971; MOORE & HARRISS, 1972). En macroinvertebrados pueden darse efectos adversos en el crecimiento y desarrollo a niveles entre 1 y 5 µg /l de PCBs tras largos periodos de exposición, casos en los que se pueden superar los 30 mg/kg en los organismos (SANDERS & CHANDLER, 1972; NIMMO *et al.*, 1975). Estudios a largo plazo en truchas indican que concentraciones inferiores a los 100 mg/kg de PCBs pueden no afectar al crecimiento (LIEB *et al.*, 1974; MAYER *et al.*, 1977; MAYER *et al.*, 1985).

La reproducción de especies de zooplancton no resultó afectada tras exposiciones a concentraciones de PCBs superiores a 1 µg/l. (NEBEKER & PUGLISI, 1974; DILLON *et al.*, 1990). En el caso de invertebrados mayores no se apreció una destacada inhibición entre 1 y 3 µg/l de PCBs en los estudios examinados, dándose efectos adversos para concentraciones superiores a los 10µg/l., alcanzando entonces la concentración en tejidos niveles que superaron los 30 mg/kg de PCBs (NEBEKER & PUGLISI, 1974; ROESIADI *et al.*, 1976; BORGMANN *et al.*, 1990).

Otros estudios indican que la resistencia a enfermedades bacterianas, como las producidas por *Vibrio*, *Aeromonas*, y *Yersinia*, no se vio comprometida en truchas expuestas a concentraciones de PCBs en agua y dieta mayores a los encontrados en sus sistemas (SNARSKI, 1982; MAYER *et al.*, 1985; CLELAND *et al.*, 1988b).

Las observaciones bioquímicas y celulares en organismos expuestos a PCBs han demostrado que pueden darse cambios en los niveles de actividad a concentraciones inferiores a las descritas en la bibliografía (NIIMI, 1996). La respuesta bioquímica asociada con la reproducción indica que pueden ocurrir posibles efectos adversos a causa de una reducción de los niveles de testosterona, andrógenos, y vitelógenos (SIVARAJAH *et al.*, 1978b; CHEN *et al.*, 1986; THOMAS, 1988). Otras respuestas adversas mencionadas resultan menos concluyentes. Se vieron afectados productos relacionados con el metabolismo del tiroides en peces expuestos a PCBs (MAYER *et al.*, 1977; FOLMAR *et al.*, 1982). La exposición de peces a PCBs puede no alterar la composición lipídica de éstos, pero puede incrementar los niveles de peroxidación de lípidos y alterar la deposición en el hígado (NIMMO *et al.*, 1975; WOFFORD & THOMAS, 1988).

Los cambios observados en la estructura celular fueron comparados a los obtenidos en organismos salvajes. La mayoría de los cambios en peces se asocian con el núcleo, donde los componentes se separan y se desarrollan pseudoinclusiones (HACKING *et al.*, 1977).

Los PCBs tienen poca o ninguna capacidad para inducir lesiones hepáticas en truchas expuestas mediante dieta (HENDRICKS *et al.*, 1981; SHELTONS *et al.*, 1984). La exposición de truchas a altos niveles de PCBs en la dieta tampoco afectaron mecanismos de protección como la inmunomodulación humoral y la actividad de las células asesinas (CLELAND & SONSTEGARD, 1987; CLELAND *et al.*, 1988a).

### **Efectos de la concentración de PCB en organismos salvajes**

Las investigaciones de laboratorio generalmente indican que las concentraciones en el agua o en los tejidos que podrían causar alteraciones son mayores que las mencionadas para ecosistemas contaminados. La concentración en la columna de agua en el rango de  $\mu\text{g/l}$  que sería letal para los organismos de mayor sensibilidad, como el caso del fitoplancton, sería mayor que la mencionada en los ecosistemas contaminados en un factor aproximado de  $10^3$ . Estas grandes diferencias en la concentración letal y la hallada en el sistema podrían sugerir que una toxicidad aguda por PCBs no resulta una amenaza importante para muchos de los organismos de los diferentes ecosistemas acuáticos.

De modo similar, en el caso del crecimiento y la reproducción, las concentraciones de PCBs que puede alterar la reproducción en una variedad de especies estudiadas en el laboratorio fueron mayores que las obtenidas del medio natural en un valor de  $10^2$  (NIIMI, 1996).

Las observaciones histológicas en peces salvajes se han centrado en la histopatología del hígado y los órganos reproductores. Los PCBs pueden no ser un factor importante en el inicio de una lesión de las células hepáticas, pero podrían tener un efecto sinérgico en presencia de otros productos químicos. La importancia ecotoxicológica de los PCBs al respecto resulta difícil de señalar debido a la interacción con otros contaminantes. Además, aún no se ha demostrado de manera certera el factor letal o crónico de las lesiones hepatocelulares para el caso de los peces (NIIMI, 1996).

La oxigenasa de función mixta (MFO) consiste en un mecanismo de desintoxicación en aquellos animales que pueden aumentar la eliminación de algunos productos químicos hidrofóbicos a partir de una serie de reacciones oxidativas. Este

sistema se encuentra presente en la mayoría de los vertebrados acuáticos y en algunas especies de invertebrados, y la inducción de su actividad es en ocasiones usada para detectar la exposición a productos químicos (PAYNE *et al.*, 1987). Existen determinados aspectos en el aumento de la actividad que están siendo examinados más detalladamente, pues se cree que intermediarios o productos secundarios resultantes de las distintas reacciones podrían ser más tóxicos que los componentes iniciales (MCFARLAND & CLARKE, 1989). Algunos esteroides asociados con la reproducción pueden ser oxidados o alterados por el aumento de actividad del MFO y afectar con ello la oogénesis (FREEMAN *et al.*, 1982; KLOTZ *et al.*, 1983; SPIES & RICE, 1988). Si asumimos que existe una asociación entre el aumento continuado de la actividad del MFO y el deterioro de la reproducción, los PCBs podrían tener un efecto adverso en la reproducción de peces salvajes, ya que los estudios de campo muestran cómo los niveles de actividad del MFO en peces de ecosistemas contaminados son mayores que los registrados para peces de lugares control (LUXON *et al.*, 1987; WINSTON *et al.*, 1989). Tal importancia toxicológica de los PCBs en la actividad del MFO no puede confirmarse hoy en día, debido a que no ha sido aún establecida una relación causa-efecto.

Los PCBs se han asociado directa o indirectamente con otras respuestas señaladas en organismos salvajes. Una evaluación más profunda sugiere que tales respuestas podrían resultar pobremente correlacionadas o no directamente atribuibles a la exposición de PCBs (NIIMI, 1996).

Los PCBs, como entidad química, parecen tener únicamente limitados efectos adversos en organismos acuáticos, basándonos en la extrapolación de los estudios de laboratorio a las observaciones de campo. Esta opinión no tiene en cuenta la visión general de que los PCBs y otros halogenados orgánicos puedan tener mecanismos de acción similares e inducir respuestas similares (NIIMI, 1994). Análisis comparativos sobre la relación de toxicidad de los PCBs y dioxinas cloradas y furanos detectados en salmónidos procedentes de los Grandes Lagos utilizando factores de equivalencia tóxica (TEFs) indican que la toxicidad relativa de los PCBs es mayor. Además, algunos efectos tóxicos podrían atribuirse a efectos acumulativos de éstos y otros contaminantes químicos que actúan con los mismos mecanismos de acción (NIIMI & OLIVER, 1989b; WILLIAMS & GIESY, 1992). La importancia toxicológica de los PCBs puede considerarse de gran magnitud, debido a su distribución ubicua y a la presencia de otros contaminantes químicos en los ecosistemas acuáticos (NIIMI & OLIVER, 1989b).

En resumen, se concluye que las concentraciones de PCBs detectadas en aguas y organismos acuáticos no parecen ser tóxicas de forma aguda para la mayoría de la comunidad acuática, pues las concentraciones ambientales suelen estar aproximadamente en niveles de uno a dos órdenes de magnitud por debajo de las concentraciones señaladas como letales por los estudios de laboratorio. Estos estudios sugieren que una concentración de PCBs en tejidos mayor de 25 mg/kg en macroinvertebrados y superiores a 50 - 100 mg/kg en peces podrían causar efectos adversos en el crecimiento y la reproducción. La exposición a PCBs puede alterar la actividad química y las células a niveles micro y ultraestructural, a concentraciones detectadas en tejidos de macroinvertebrados y peces procedentes de aguas altamente contaminadas. Poco se sabe sobre la extensión de estos cambios, y menos aún sobre los efectos sobre el organismo. Una opinión general sugiere que compuestos químicos con mecanismos de acción similar a los PCBs puede afectar adversamente la reproducción de peces y otros organismos acuáticos, probablemente a partir de niveles bioquímicos y celulares (NIIMI, 1996).

### 2.3.2. DDTs EN ANIMALES ACUÁTICOS

Los DDTs, al igual que otros productos químicos organoclorados, son lipofílicos y, como resultado, bioacumulables en los tejidos grasos. Se han descrito en especies acuáticas desde el Ártico hasta el Antártico (SUBRAMANIAN *et al.*, 1983; 1988a,b; TANABE *et al.*, 1983, 1986; TANABE & TATSUKAWA 1986). Tales compuestos se les reconoce en la actualidad como sustancias químicas capaces de provocar importantes disfunciones en los sistemas endocrino, inmunológico, y nervioso: disruptores hormonales (COLBORN & CLEMENT 1992). Aquellos individuos cuyos sistemas se ven afectados en presencia de estos contaminantes químicos pueden parecer a simple vista normales pero suelen sufrir muertes tempranas o, en casos de individuos adultos, quedar infértiles como resultado de la exposición (COLBORN & SMOLEN, 1996). Estas alteraciones en los individuos pueden llegar a tener consecuencias graves en los niveles de población si el problema llega a extenderse.

Por ejemplo, las muertes masivas de focas en el Mar Báltico y Mar del Norte (DIETZ *et al.*, 1989), de delfines a lo largo de la costa Este de los Estados Unidos (GERACT, 1989), y de delfines *Stenella coeruleoalba* en el Mar Mediterráneo (DOMINGO

*et al.*, 1992; AGUILAR & RAGA, 1993; KANNAN *et al.*, 1993c; AGUILAR & BORRELL 1994b; AZNAR *et al.*, 1994; FORCARDA *et al.*, 1994) han provocado la hipótesis que los contaminantes químicos sintéticos podrían estar implicados en estos sucesos, mediante la reducción de las competencias del sistema inmune de los animales, incrementando así, su vulnerabilidad a las infecciones (SIMMONDS, 1992, 1994). Por otro lado, las cantidades de contaminantes atrapados en las reservas lipídicas pueden llegar a ser una fuente adicional de estresantes cuando son liberados a la circulación sanguínea de un animal infectado durante su lucha contra los virus o bacterias (SIMMONDS, 1994). Estas muertes han generado también conciencia sobre el estado de otras especies marinas alrededor del mundo. Con el fin de preservar el estado de las poblaciones de especies amenazadas o en peligro de extinción, se han desarrollado iniciativas encaminadas a estudiar, no sólo los niveles de contaminantes químicos en las especies marinas, sino también intentar descubrir los efectos adversos que puedan desarrollarse en los organismos y que pueden contribuir a la extinción de la especie (MCFARLAND & CLARKE, 1989).

El cociente de concentración de DDT y DDE en tejidos proporciona relevantes indicios acerca de la edad del contaminante químico en el medio ambiente y, en algunos casos, acerca de la exposición inmediata del animal (BACON *et al.*, 1992). Cuando son liberados al medio, los pesticidas son en un primer momento, DDT y, a través de la acción de los agentes atmosféricos y el metabolismo, el DDT es convertido primeramente a DDE y posteriormente a DDD. Los cetáceos que habitan en aguas de las costas del norte de Europa, este de Canadá, y oeste de Estados Unidos comenzaron a mostrar una importante disminución en los niveles de DDT a favor de sus metabolitos durante los años 80 (ADDISON *et al.*, 1984), posiblemente como un reflejo de la disminución en el uso generalizado de DDT (AGUILAR, 1984) siguiendo las restricciones de su aplicación en todo el territorio de los Estados Unidos a principios de los años 70. Sin embargo, el cociente de DDT a DDE/DDD permanece alto en las poblaciones de cetáceos del noroeste del Océano Pacífico, el Océano Índico, y aguas del Antártico, reflejando la continuación del uso de DDT en otras partes del mundo (TANABE *et al.*, 1986).

La concentración media de DDTs en marsopas del Mar Negro estudiadas por TANABE *et al.* (1997a,b) fueron mayores que la de otros cetáceos de países europeos, y de los océanos Pacífico e Índico. Sin embargo, fueron inferiores a los procedentes del Mar Mediterráneo (TANABE *et al.*, 1997a,b). Como antes se mencionó, en la mayoría de

los países desarrollados el uso de pesticidas organoclorados fue prohibido durante los años 70 y 80. Algunos países del este de Europa tales como Rumanía y la URSS también han restringido el uso de los DDTs (KUTZ *et al.*, 1991). En Turquía, se usaron pesticidas organoclorados en cantidades anuales de 1000-2000 toneladas entre 1976-1983 (KARAKAYA & OZLAP, 1987). El uso de éstos en otros países cercanos al Mar Negro no está claro. Estas observaciones sugieren que algunos organoclorados, en particular el DDT son aún usados de manera ilegal y se han vertido de manera intensiva en los recientes años a las aguas del Mar Negro. Se detectaron concentraciones similares a las citadas en pequeños cetáceos en las costas de Hong Kong (MINH *et al.*, 1999). En este caso, como sucede en la mayoría de los estudios, el *p,p'*-DDE presenta la mayor concentración. AGUILAR (1984) sugiere un valor para el cociente entre *p,p'*-DDE/DDT de 0.6 en mamíferos marinos como indicativo de un consumo reciente de DDT. El estudio realizado por MINH *et al.* (1999) concluye en una liberación reciente de DDTs al ecosistema en Hong Kong. Los elevados niveles de DDT encontrados en los cetáceos de Hong Kong se relacionan con la utilización de DDT en este país hasta el año 1989 (PHILLIPS & TANABE, 1989).

### **2.3.3. FACTORES BIOLÓGICOS QUE AFECTAN LA PERSISTENCIA DE LOS NIVELES DE CONTAMINANTES EN EL ORGANISMO**

La exposición de determinados organismos a determinados contaminantes es comúnmente estudiada a través de la concentración de la sustancia objetivo en los tejidos adecuados del organismo. Esto es evidentemente más fácil y más exacto efectuarlo así que realizar la medida directa o, a través de la dieta, o de otras fuentes de exposición, por lo que este método se usa generalmente para controlar la exposición de la población y para identificar aquellos componentes del ecosistema susceptibles a tales contaminantes (AGUILAR *et al.*, 1999).

Sin embargo, cuando se estudia un número lo suficientemente amplio de individuos pertenecientes a la misma población, se observa una variación sustancial en los niveles de residuos encontrados en los tejidos. Lo que sugiere que componentes de la misma población, aun expuestos a las mismas condiciones ecológicas, no se exponen de manera idéntica a los contaminantes y que su capacidad de excreción de los mismos es también diferente. Ello indica que comparar resultados sea frecuentemente



complicado así como asegurar la extensión de la exposición, debido a las diferencias significativas que aparecen a nivel tisular entre individuos de diferentes sexos, edad, estado reproductivo o condición nutricional (AGUILAR *et al.*, 1999).

### **Factores principales que afectan la variación individual**

#### **Dieta**

La mayoría de las sustancias que actúan como contaminantes químicos persistentes se incorporan al cuerpo de los mamíferos mediante la ingesta de alimentos, por lo que en los estudios de polución de cetáceos se acepta el axioma general de que la dieta determina la carga xenobiótica de una especie (AGUILAR *et al.*, 1999).

El efecto de la dieta es particularmente importante porque muchos tóxicos persistentes aumentan su concentración a través de la cadena trófica, siendo la concentración en los grandes predadores mucho mayor que en aquellos organismos que ocupan niveles tróficos más bajos. Este aumento de la concentración de una sustancia en un organismo relacionado con la dieta es comúnmente conocido como biomagnificación o bioacumulación, el cual depende de varios factores. En pequeños animales con agallas la división equitativa de los contaminantes químicos entre los lípidos corporales y el ambiente parece ser el principal factor de regulación en la acumulación de contaminantes. Mientras que en predadores que respiran como los mamíferos marinos, la biomagnificación se cree que ocurre porque la mayoría de los contaminantes son ampliamente conservados a lo largo de la cadena trófica, y la comida a través de la cual son transferidos es parcialmente transformada en energía o excretada (JANSEN *et al.*, 1993).

El potencial de biomagnificación varía ampliamente entre los contaminantes. De manera general se ha aceptado que es mayor para la mayoría de los compuestos organoclorados, particularmente para aquellos con mayor peso molecular y abundantes sustituciones de los átomos de cloro, por ejemplo DDT, muchos PCBs, clordano, toxafeno y terfenilos policlorados (PCTs) (AGUILAR *et al.*, 1999). Entre los PCBs, el potencial de biomagnificación varía con la estructura y se ha demostrado que los congéneres con posiciones insustituibles vecinas (especialmente *meta* y *para*) son selectivamente metabolizados por mamíferos marinos (BOON *et al.*, 1992).

Para aquellos contaminantes en los que la biomagnificación es importante, la dieta resulta un factor determinante en la concentración de los tejidos. Realmente, se espera así poder explicar la mayoría de las variaciones interespecíficas que se dan entre

cetáceos que habitan en las mismas aguas. Sin embargo, independientemente del factor de bioacumulación, algunos organismos pueden mostrar especificidad para la acumulación de un determinado compuesto lo que puede llevar a un aumento de los niveles del mismo en los subsiguientes estados de la cadena trófica. Por ejemplo, los niveles de níquel en ballenas son comparativamente mayores que en odontocetos (AGUILAR *et al.*, 1999).

Sin embargo, es importante recordar que la dieta puede variar sustancialmente a niveles intraespecíficos o interespecíficos. Particularmente, la variación en la dieta asociada con la edad y el sexo, sobre todo en especies con dimorfismo sexual, ha sido estudiada para gran número de especies, incluyendo cachalotes (CLARKE *et al.*, 1993), ballenas blancas (SEAMAN *et al.*, 1982), delfines moteados (BERNARD & HOHN, 1989) y marsopas (RECCHIA & READ, 1989). Estas diferencias pueden ser causadas por la poca habilidad de los individuos jóvenes a inmersiones profundas, o los diferentes requerimientos en la composición de la dieta durante el crecimiento o estados reproductivos. Los cambios en la dieta pueden, en ocasiones, resultar en variaciones sustanciales en el tipo de organismo consumido o incluso en el nivel trófico explotado. Lo cual puede tener consecuencias no sólo en la cantidad de contaminante ingerida, también en su relativa abundancia. Por ejemplo, las concentraciones tisulares de cadmio en especies consumidoras de calamares son mayores por la capacidad de los calamares de mantener altos niveles de este metal (SZEFER *et al.*, 1994).

Esta variación relacionada con la edad y/o el sexo en la dieta influye indudablemente en la variación intrapoblacional de los niveles de contaminantes, aunque reconocer este efecto puede ser complicado salvo en los casos en que las variaciones en las dietas se vienen produciendo desde hace tiempo. Tal es el caso encontrado por TANABE *et al.*, (1984) donde rorcuales aliblanco del Hemisferio Sur en edad juvenil presentan niveles de PCBs y DDTs mayores que aquellas en edad adulta. Este contraste que cabría esperarse debido a las tendencias típicas relacionadas con la edad en otras especies, lo asocian los autores a un cambio en la dieta según la edad. Se ha observado que los rorcuales aliblanco inmaduros se mantienen a bajas latitudes durante el verano comiendo además de eufiásidos, copépodos y peces, mientras que los adultos que migran a latitudes más altas basan sus dietas únicamente en eufiásidos (menos contaminados) (AGUILAR *et al.*, 1999).

Finalmente, hay que señalar que la dieta afecta también a las enzimas responsables de la desintoxicación. El sistema MFO es un complejo multienzimático

que se ha encontrado más activo en aquellas especies con amplio espectro en la dieta que en aquellas que se alimentan de un número limitado de especies (AGUILAR *et al.*, 1999). Se ha observado que la capacidad de desintoxicar compuestos extraños es mayor en herbívoros que en carnívoros pues los primeros frecuentemente se ven expuestos a mayor número de tóxicos naturales que los últimos. Esta relación entre la capacidad de desintoxicación y la dieta ha sido postulada para explicar las diferencias de adaptación a la polución en un número de aves y especies mamíferas (WALKER, 1980; FOCARDI *et al.*, 1988; FOSSI *et al.*, 1988) y juega también un papel importante en la dinámica de los contaminantes en otros grupos de organismos.

### **Talla corporal**

La talla corporal juega un complejo papel en la variación interespecífica de concentración de contaminantes. Por un lado, la tasa de eliminación de compuestos extraños por peso corporal en mamíferos disminuye con el aumento del peso corporal (PARKE, 1980). Lo mismo ocurre para la actividad de enzimas desintoxicadoras, concretamente para los sistemas microsomal mono-oxigenasa que contienen citocromo P450 (WALKER, 1980). Estos dos factores podrían, en principio, combinarse favoreciendo la acumulación de mayores niveles de tóxicos en especies de talla mayor. Sin embargo, existe una relación inversa entre la tasa de metabolitos y la talla corporal y, como la tasa de metabolitos se correlaciona también con la capacidad de acumular contaminantes en vertebrados (MORIARTY, 1984), las mayores tasas de acumulación se esperan en un principio que se den en especies de menor talla.

Aunque estos dos efectos se oponen, en la mayoría de las especies la influencia de la tasa de metabolitos deja atrás la combinación de los otros dos factores. Así, en modelos de acumulación de contaminantes, el factor de concentración es más dependiente de la tasa diaria de comida consumida por el predador como una proporción del peso corporal del predador (relacionada inversamente a la talla corporal) y, de acuerdo, a la media de concentración de tóxicos dentro de los límites de la presa (MORIARTY, 1984). De esta forma, la mayoría de los animales pequeños tienden a llevar altas cargas de contaminantes en relación a su peso corporal a pesar de tener mayor actividad enzimática y mayor tasa de eliminación (AGUILAR *et al.*, 1999).

El efecto de la masa corporal no suele ser tenido en cuenta dentro de los estudios interespecíficos de variación en los niveles de contaminantes, siendo la mayoría de las variaciones observadas atribuidas a las diferencias en la dieta. Esta falta de información

puede dificultar la predicción de la actual influencia de la masa corporal en la concentración de residuos antropogénicos. AGUILAR *et al.*, (1999) sugieren un sencillo modelo: *Sí se acepta que la carga corporal de un determinado contaminante es directamente proporcional a la cantidad de dicho contaminante que se ha absorbido a través del intestino. O de otra forma, suponiendo una concentración determinada de contaminantes en la comida, la cantidad de contaminante absorbida es directamente proporcional a la cantidad de comida ingerida.* Aunque la cantidad de biomasa obtenida de la comida ingerida dependerá de un número de factores tales como la eficacia y calidad (principalmente del contenido calórico) de la comida, ésta es proporcional a la tasa metabólica del individuo y con ello a su masa corporal. De lo anterior, los autores concluyen que en especies de poca talla corporal el efecto de la talla es dramático. Como consecuencia del rápido aumento en la tasa de metabolitos en una pequeña masa corporal, tanto la carga corporal como, particularmente, la concentración tisular de sustancias tóxicas, aumentan significativamente. Realmente, este efecto es con toda probabilidad más importante en la explicación de las variaciones de concentración de contaminantes en tejidos de diferentes especies que habitan en las mismas aguas que pequeñas diferencias en la dieta o en otros determinantes biológicos (AGUILAR *et al.*, 1999).

### **Composición corporal**

La distribución de contaminantes en un organismo es compleja, pero principalmente depende de las propiedades físicas y químicas de los componentes que lo forman. Algunos contaminantes, tales como los organoclorados, organobromados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHA), son lipofílicos y tienden acumularse en tejidos ricos en grasas. Esta propiedad implica que un organismo con grandes compartimentos de grasa tendrá gran capacidad para retener tales contaminantes químicos (AGUILAR, 1985). Además, la composición corporal afecta a la contribución relativa de cada parte del cuerpo a la carga corporal total de contaminantes. Así, un órgano contribuirá de manera más importante a la carga total de contaminantes cuanto mayor sea su contenido en grasa o, como en el caso del músculo, cuanto mayor sea su representación en la masa corporal (AGUILAR, 1985).

### **Condición nutritiva**

Una de las principales funciones de la grasa es la de servir como almacén de energía, por lo que su contribución a la masa corporal depende de la condición del individuo. En especies sujetas a una estricta migración estacional y a regímenes nutricionales, la grasa corporal puede variar de manera dramática a lo largo del año. Se ha observado en algunas ballenas cómo su peso corporal aumentaba en un 50-100 % al final del período de alimentación principalmente a causa de la acumulación de grasa (LOCKYER & BROWN, 1981). La gran talla que presentan las ballenas se ha asociado con la necesidad de acumular cantidades sustanciales de reservas lipídicas para cubrir la migración y los requerimientos reproductivos durante los períodos de escasa o falta de alimentación (BRODIE, 1975).

Las variaciones nutritivas pueden dar lugar a diferencias en el contenido lipídico de los tejidos, tanto en volumen como en composición. Se han descrito cambios en huesos, riñones y otros órganos de manera significativa para un número importante de especies (AGUILAR *et al.*, 1999).

Las variaciones en la riqueza de lípidos tienen implicaciones sobre la dinámica de los contaminantes lipofílicos, aunque los efectos en la concentración a nivel tisular siguen actualmente sin ser clarificados. Cuando los lípidos se movilizan, son posibles dos casos extremos: a) Cada contaminante abandona el tejido junto a los lípidos a los cuales están confinados, o b) Permanecen en el tejido. En el primer caso, aumentaría proporcionalmente la cantidad de lípidos movilizados, mientras que en el segundo caso la concentración tisular permanecería constante. Los estudios sugieren que los procesos analizados sostienen un término intermedio. En otras palabras, la movilización de lípidos resulta en un aumento de los niveles tóxicos, pero la variación no es tan alta como un modelo puramente concentrador pudiera sugerir. La razón para este proceso intermedio de acumulación no está clara, pero parece ser que una movilización parcial de la fracción más polar del total de los contaminantes y el aumento de la capacidad de metabolización y excreción cuando la concentración tisular de contaminantes aumenta, atenúa el aumento producido por la movilización de lípidos (AGUILAR, 1987).

### **Incidencias de enfermedades**

La mayoría de los estudios realizados sobre la concentración de contaminantes en los distintos organismos estudiados se llevan a cabo a partir de individuos muertos. Aunque en la mayoría de los casos, la causa de la muerte de estos animales no está clara, excepto en áreas en las que las interacciones pesqueras son frecuentes, la

enfermedad es ciertamente la fuente más probable de mortalidad. Existen diversas razones por las cuales un organismo enfermo puede llevar una carga anormal de contaminantes en su organismo. Por ejemplo, un animal que ha estado enfermo durante un período largo de tiempo es probable que se encuentre desnutrido o se haya alimentado de fuentes diferentes de las que constituyen su dieta habitual. Además, muchas enfermedades afectan los centros metabólicos viéndose así alterada la capacidad de metabolizar o excretar determinados tóxicos. Por ello resulta cuestionable si la concentración en los tejidos de dichos organismos son representativos o no de unas condiciones normales. Los efectos de un cambio en la dieta o la movilización de grasas de tejidos contaminados, particularmente si los tóxicos resultan lipofílicos, se han discutido anteriormente. En términos generales, se espera un aumento de la concentración cuando el individuo aumenta de peso. Sin embargo, los efectos de las alteraciones fisiológicas y metabólicas resultan ser desconocidos en la mayoría de los casos estudiados (AGUILAR *et al.*, 1999).

La existencia de una relación causa-efecto entre la susceptibilidad a la enfermedad y los niveles altos de contaminantes químicos ha sido el centro de una sustancial controversia que continúa sin ser aclarada (KENNEDY, 1999). Se incluyen como posibles explicaciones la inmunodepresión a causa de los tóxicos, la movilización de los contaminantes de los tejidos de reserva en individuos que pierden peso a causa de la enfermedad, o la presencia de alteraciones en las funciones fisiológicas que conducen a aumentar la concentración (AGUILAR & BORRELL, 1994b).

La mayoría de las discusiones sobre los efectos de la enfermedad en los niveles de sustancias tóxicas o viceversa se han centrado en los contaminantes lipofílicos, ya sea por la capacidad inmunodepresora de alguno de ellos y su asociación con la dinámica de lípidos, y, por ende, con el factor nutricional (AGUILAR *et al.*, 1999).

### **Edad y sexo**

La mayoría de los cetáceos habitan en zonas alejadas respecto a los puntos considerados fuentes de contaminación y son por ello afectados únicamente por contaminantes persistentes, es decir, aquellos que no son degradados de forma rápida por el medioambiente. En muchos casos, principalmente para los contaminantes químicos altamente lipofílicos, la persistencia está asociada con la acumulación, lo que significa que tales tóxicos son retenidos por los tejidos corporales y sus vidas medias en el organismo son largas (AGUILAR *et al.*, 1999).

Por definición, para considerar un contaminante persistente, su entrada debería en un principio exceder a la combinación de su metabolismo y tasa de excreción. En tal situación, la concentración en los tejidos es de esperar que aumente progresivamente con la edad a lo largo de la vida del individuo, siendo la pendiente del aumento proporcional a la diferencia entre la tasa de entrada y la tasa de metabolización sumada a la excreción (AGUILAR *et al.*, 1999).

Sin embargo, las respuestas homeostáticas activan los mecanismos fisiológicos para contrarrestar o eliminar los productos químicos no deseados. Cuando estos mecanismos están activados, el incremento inicial en los niveles de concentración en los tejidos se para y el organismo alcanza un equilibrio en el que la capacidad de degradación supera la entrada de nuevos contaminantes. En esta situación, la pendiente de relación entre la edad y la concentración de tóxicos en los tejidos tiende a disminuir en los individuos de mayor edad (AGUILAR *et al.*, 1999).

Así, la variación de carga de un tóxico depende de su dificultad de excreción, su capacidad para activar procesos de metabolización y su resistencia a tales procesos. Mientras que las propiedades físicas y químicas de los diferentes xenobióticos son muy variables, la fisiología de los procesos de desintoxicación es muy homogénea entre las especies relacionadas taxonómicamente. Por esta razón, las diferencias observadas para un determinado compuesto debido al factor de la edad son similares, y las diferencias observadas con la edad para un determinado compuesto resultan también similares entre las diferentes especies de cetáceos (AGUILAR *et al.*, 1999).

En la gran mayoría de los casos estudiados por AGUILAR *et al.*, (1999) se encontró una relación positiva entre la edad y la concentración de contaminantes y, cuando éste no era el caso, la tendencia no quedaba clara pero nunca indicaba una disminución de la concentración.

En un estudio realizado por TANABE *et al.*, (1997a) en marsopas (*Phocoena phocoena*) en el Mar Negro, las hembras maduras analizadas mostraron niveles inferiores respecto a los mismos contaminantes, al contrario de lo ocurrido en machos que muestran una relación directa entre la concentración de contaminantes y la edad. Se han obtenido resultados similares en varias especies de cetáceos (TANABE *et al.*, 1987b; AGUILAR & BORRELL, 1988; SUBRAMANIAN *et al.*, 1988b; COCKCROFT *et al.*, 1989). Estas bajas concentraciones de residuos en hembras de edad adulta han sido explicadas por la transferencia durante la lactancia de estos compuestos a sus descendientes. Las diferencias encontradas respecto a varios estudios de cetáceos se creen probablemente

asociadas con la duración de los periodos de lactancias de las diferentes especies. Cuánto más largos sean éstos las diferencias en concentración de compuestos organoclorados entre los dos sexos serán mayores (TANABE *et al.*, 1997a,b).

Por otro lado se ha observado cómo contaminantes químicos de naturaleza lipofílica atraviesan fácilmente la membrana de la placenta hacia el feto. Este paso resulta más fácil para aquellos compuestos de bajo peso molecular, que en el caso de los organoclorados corresponde a los de menor número de átomos de cloro en sus moléculas (JUCHAU, 1983). Como anteriormente se mencionó los compuestos lipofílicos son también transferidos rápidamente a la leche (RIDGWAY & REDDY, 1995). De nuevo, hay diferencias según las propiedades físicas y químicas de los compuestos; los organoclorados con alto número de átomos de cloro son transferidos de manera menos eficiente de los depósitos lipídicos corporales al sistema circulatorio, y de ahí a la leche, que los menos clorados (AGUILAR & BORRELL, 1994c). La transferencia es mucho mayor durante la lactancia (7-98 % según la especie y el componente) que durante el embarazo (0.5-9.4 %). La cantidad total de organoclorados transferidos durante el total del ciclo reproductivo se estima en un rango de 7-100 %, dependiendo de la especie y el compuesto (AGUILAR *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha observado que la capacidad de desintoxicación en mamíferos hembras es normalmente menor que en los machos. Aparentemente, el balance entre las hormonas sexuales masculinas y femeninas es importante para determinar la actividad del citocromo P450 y otras enzimas responsables de la degradación de contaminantes (SIPES & GANDOLFI, 1991). Es por todo ello, que ambos sexos deberían de ser estudiados por separado.

Los mecanismos mencionados de acumulación, degradación o excreción afectan obviamente de diferente manera a los distintos compuestos organoclorados según su estructura química y sus propiedades físico-químicas. Como consecuencia, su abundancia relativa en los tejidos no sólo dependerá del ambiente, también dependerá de la edad, sexo e historia reproductiva del individuo en concreto. Por ello, en mamíferos marinos las proporciones DDT/PCB y DDE/DDT han sido usualmente mayores en los machos que en las hembras. Éstos resultados, a su vez, son típicamente mayores en machos adultos que en hembras adultas (SUBRAMANIAN *et al.*, 1987; AGUILAR & BORRELL, 1988; BORRELL, 1993a; STERN *et al.*, 1994; BORRELL *et al.*, 1995; 1996).



#### 2.3.4. IMPLICACIONES TOXICOLÓGICAS EN MAMÍFEROS MARINOS

La posición de los mamíferos marinos en el más alto nivel de la cadena trófica, y el carácter de biomagnificación que acompaña a los organoclorados, convierten a los cetáceos en el objetivo principal de la gran mayoría de los estudios realizados sobre organoclorados en organismos de vida acuática. Este motivo, junto al hecho de que las conclusiones halladas para los mamíferos marinos pueden ser de manera general extrapoladas al caso de las tortugas marinas, nos han llevado a considerar la necesidad e importancia de redactar un pequeño capítulo que haga mención a la bibliografía existente al respecto.

Han pasado aproximadamente 34 años desde que se detectaron PCBs en mamíferos (JENSEN, 1972) y 25 años desde que se estableció una conexión entre la exposición a los PCBs y los daños en la reproducción en visones (*Mustela vison*) (RINGER *et al.*, 1972; PLATONOW & KARSTAD, 1973; RINGER, 1983; AULERICH *et al.*, 1985). Como resultado de estos descubrimientos, se llevaron a cabo otros experimentos adicionales con animales domésticos o de laboratorios, así como estudios de residuos de PCBs en mamíferos salvajes que fueron publicados durante los años 70 y 80. Los estudios de laboratorio (ZEPP & KIRKPATRICK, 1976; SLEIGHT, 1983; FULLER & HOBSON, 1987) confirmaron los efectos encontrados en los visones y obtuvieron una mayor descripción de la toxicidad de los PCBs en una variedad de mamíferos. Algunos de los campos estudiados fueron las investigaciones epidemiológicas que apuestan por confirmar la relación entre los niveles de PCBs y los efectos tóxicos, especialmente los fallos en la reproducción. Principalmente, los estudios realizados se centraron en mamíferos marinos. Son diversos los factores que dificultan establecer la relación entre los niveles de residuos y la toxicidad producida, tales como la presencia de otros compuestos químicos, organismos patógenos y la alteración del hábitat causada por actividades humanas.

Junto con lo expuesto, se pueden citar otras causas o argumentos que podrían influir en el aumento de la dificultad a la hora de obtener una buena interpretación de los resultados a partir de los trabajos de campo realizados sobre mamíferos (KAMRIN & RINGER, 1996):

- El estado del animal en el momento de su captura.
- Tratamiento dado a la muestra entre la toma y el análisis de la misma. Es crítico establecer correctamente el protocolo para estas operaciones.
- El estado reproductivo del animal.
- El método analítico usado.

Como resultado de las consideraciones mencionadas, los trabajos de campo no cuentan con rigor científico para confirmar la asociación entre los niveles de PCBs y los efectos adversos. Tal confirmación sólo es posible, en la actualidad, a partir de los pocos estudios realizados sobre mamíferos bajo condiciones experimentales controladas. El uso de los resultados obtenidos en trabajos de campo debe hacerse de manera cautelosa teniendo en mente las consideraciones arriba mencionadas (KAMRIN & RINGER, 1996).

Los mamíferos marinos, como los delfines, constituyen un importante objeto de estudio sobre los efectos de la acumulación de los contaminantes oceánicos, tal es el caso de los organoclorados. El tejido adiposo de estos mamíferos marinos representa un porcentaje destacable dentro de su composición corporal y está constituido por grasa rica en lípidos y triglicéridos, que es usada para la nutrición, flotación y aislamiento, siendo un depósito ideal para estos contaminantes lipofílicos (COCKROFT *et al.*, 1989). Ésto unido al hecho de que son animales con un largo periodo de vida justifica que lleguen a almacenar elevadas concentraciones de compuestos tóxicos. RISEBROUGH (1978) expuso que no existe mamífero marino en ningún lugar del mundo sin una carga corporal de alguna variedad de compuestos orgánicos sintéticos, que no existían en el medioambiente hasta su creación por el hombre. Los organoclorados más inertes permanecen en la grasa de los mamíferos marinos durante sus relativamente largos períodos de vida (TANABE *et al.*, 1984; BIRNBAUM, 1985; CALAMBOKIDIS & BARLOW, 1991). Sin embargo, en momentos de cambios fisiológicos como enfermedades, temperaturas extremas, compromiso nutricional o gestación y lactancia, los organoclorados pueden ser metabolizados y repartidos por el organismo mediante la circulación sanguínea (MATTHEWS *et al.*, 1984; HUMPHREY, 1988; AGUILAR & BORRELL, 1994c). En muchos casos, son los metabolitos y no los compuestos principales los que tienen los mayores efectos tóxicos (MCFARLAND *et al.*, 1986; EISLER, 1990).

Las mayores concentraciones detectadas de organoclorados en animales de vida libre se citan para el caso de los mamíferos marinos. Dentro de éstos los odontocetos, como animales piscívoros, alcanzan los mayores niveles observados de contaminantes (COLBORN & SMOLEN, 1996).

En el caso de los DDTs, la mayor concentración establecida (225 ppm de  $\Sigma$ DDT) se citó para un ejemplar muerto de beluga (*Delphinapterus leucas*) en el Estuario de St. Lawrence, al noroeste de Canadá (MARTINEAU *et al.*, 1987). La media dentro de la población fue de 58 ppm. Los niveles de organoclorados varían de manera importante entre las diferentes especies de mamíferos marinos y dentro de las mismas especies según el área geográfica que frecuentan. Así se detectaron niveles muy inferiores (1.9-6.8 ppm) para ejemplares de belugas de la misma especie procedentes de poblaciones del norte de Canadá (MARTINEAU *et al.*, 1987).

El ratio de concentración del DDT y DDE en los tejidos resulta un indicador de la edad del químico en el ambiente y en algunos casos, de una exposición previa del animal (BACON *et al.*, 1992). Esta proporción varía entre las diferentes especies de mamíferos marinos y entre las distintas áreas geográficas (COLBORN & SMOLEN, 1996). Cetáceos que frecuentan las aguas de las costas del norte de Europa, este de Canadá y oeste de los Estados Unidos comenzaron a mostrar una disminución en la proporción de DDT y sus metabolitos durante la década de los 80 (ADDISON *et al.*, 1984), probablemente reflejando la disminución del uso de DDT tras su prohibición en 1970 (AGUILAR, 1984). Sin embargo, el ratio DDT/DDE y DDT/DDD se mantiene alto en poblaciones de cetáceos del noroeste del Océano Pacífico, Océano Índico y Antártico, lo que demuestra el continuo uso del DDT en algunas partes del mundo (TANABE *et al.*, 1986).

En el caso de los PCBs, las concentraciones observadas superan las citadas para los DDTs. Igual que ocurría para este grupo de contaminantes, los niveles detectados varían entre las distintas especies de mamíferos marinos y las áreas geográficas que frecuentan, siendo nuevamente los odontocetos los que registran las mayores concentraciones (COLBORN & SMOLEN, 1996). En el mismo estudio realizado por MARTINEAU *et al.* (1987) en belugas del Estuario de St Lawrence se registraron niveles del  $\Sigma$ PCB en un rango de 5.7-576 ppm, con una media de 141 ppm. Dentro de los congéneres de PCBs detectados destacan por sus altos niveles el 118, el 138, el 153 y el 180 (COLBORN & SMOLEN, 1996). Los tres últimos categorizados por SAFE (1990) como congéneres de baja toxicidad por poseer al menos dos átomos de cloro en posición orto,

pero considerados por MCFARLAND & CLARKE (1989) de gran importancia en cuanto a su potencial toxicidad y su alta prevalencia en los ecosistemas.

Los organoclorados son transferidos de una generación a la siguiente principalmente a través de la lactancia y no durante la gestación (FUKUSHIMA & KAWAI, 1981; TANABE *et al.*, 1982; SUBRAMANIAN *et al.*, 1988a,b). Los estados de vida durante la lactancia son los más críticos del desarrollo y crecimiento (BECKMAN *et al.*, 1999) y son por ello los organismos, a esta edad, más sensibles a los efectos de las toxinas que les pueden llegar de su madre mediante la leche rica en grasa (HOLDEN & MARSDEN, 1967; ADDISON & BRODIE, 1977; COCKROFT *et al.*, 1989). En los cetáceos la transferencia maternal de organoclorados se considera muy importante, especialmente para el primer descendiente. COCKROFT *et al.*, (1989) sugieren que al final del primer ciclo reproductivo completo, un delfín mular (*Tursiops truncatus*) transfiere alrededor del 80 % de la carga maternal de toxinas al primogénito. FUKUSHIMA & KAWAI (1981) consideran que el primer descendiente del delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) recibe cuatro veces más organoclorados que los siguientes, siendo más de un 90 % a través de la lactancia.

Los estudios epidemiológicos sugieren que aumenta la frecuencia de epidemias y aparición de nuevas enfermedades en mamíferos marinos (HARVELL *et al.*, 1999), resultando en grandes mortalidades (AGUILAR & RAGA, 1983; MARINE MAMMAL COMMISSION, 1999). Las investigaciones en estos campos revelan frecuentemente altos niveles de organoclorados en tejidos extraídos de animales libres (GERACI, 1989; KUEHL *et al.*, 1991; KANNAN *et al.*, 1993c; AGUILAR & BORRELL, 1994b; KUEHL & HAEBLER, 1995). Las posibles relaciones entre la concentración de organoclorados y diversas patologías (BERGMAN & OLSSON, 1986; ANDERSSON & WARTANIAN, 1992; DE GUISE *et al.*, 1994b; MUNSON *et al.*, 1998) y alteraciones reproductoras (DE LONG *et al.*, 1973; HELLE *et al.*, 1976a.; JENSEN *et al.*, 1979; REIJNDERS, 1986; BELAND *et al.*, 1993; KAVLOCK *et al.*, 1996) han concienciado del peligro de los organoclorados como agentes capaces de alterar la población mundial de mamíferos marinos (TANABE *et al.*, 1982; COLBORN & SMOLEN, 1996).

Globalmente, los animales salvajes han contribuido a enriquecer la información sobre los niveles de contaminantes en los tejidos (BORRELL *et al.*, 1997). Sin embargo, los datos procedentes de estos animales suelen con frecuencia ser incompletos. Como puntualizan AGUILAR & BORRELL (1994b), la interpretación es difícil si la información procede exclusivamente de animales varados, enfermos o moribundos, ya que éstos

pueden no ser representativos de la población; usualmente hay una falta de información biológica relevante que dificulta la interpretación de los datos pudiendo cualquier muestra defectuosa alterar el resultado de los análisis (BORRELL & AGUILAR, 1990). Además, se dispone de escasa información sobre las consecuencias bioquímicas que pueden aparecer según la concentración de contaminantes en mamíferos marinos (ADDISON, 1989).

Una forma más acertada de estudiar la exposición a los contaminantes y sus efectos en mamíferos marinos vivos es buscando biomarcadores (AGUILAR & BORRELL, 1994b; FOSSI, 1994; FOSSI *et al.*, 1997; GAUTHIER *et al.*, 1999). Ya que algunos marcadores responden de manera específica a determinados contaminantes, éstos pueden ser usados para aclarar las relaciones causas-efectos (MUIR *et al.*, 1999).

## 2.4 ORGANOCOLORADOS EN REPTILES

Los reptiles son una de las clases más amenazadas dentro del grupo de los vertebrados (GIBBONS *et al.*, 2000). Actualmente se tiene en gran consideración el importante papel que juega la exposición de estos animales a la contaminación y la sensibilidad de algunas especies a los compuestos organoclorados (HOPKINS, 2000). Sin embargo, el número de estudios acerca de los efectos de estos compuestos sobre el organismo de los reptiles continúa siendo extremadamente bajo (SPARLING *et al.*, 2000).

Los reptiles pueden verse expuestos a fuentes de contaminación a través de la comida que ingieren, el agua en el que habitan, o el aire que respiran. Especies longevas y con hábitos relativamente sedentarios son ideales para monitorizar las concentraciones de contaminantes en sus tejidos, y así poder tener una idea aproximada de la contaminación que sufre el hábitat que frecuentan (BISHOP & PETTIT, 1992).

En los estudios realizados sobre la detección de organoclorados en reptiles, las concentraciones detectadas resultaron bastante semejantes a las observadas en otros vertebrados. Esta semejanza en los niveles de contaminación puede ser parcialmente un artefacto de la variación en la concentración de lípidos en los tejidos de las diferentes especies (BISHOP *et al.*, 1994).

En la bibliografía sobre la detección de compuestos organoclorados en reptiles destaca, dejando a un lado las tortugas marinas, la realizada sobre la tortuga mordedora (*Chelydra serpentina*), tortuga de agua dulce que se ve afectada de manera importante

por esos compuestos. El análisis de estos organismos y sus huevos ocupan la extensa mayoría de la bibliografía sobre reptiles, junto a estudios realizados sobre diferentes especies de serpientes.

Los huevos y órganos de la tortuga mordedora han sido recomendados como monitores de las concentraciones de hidrocarburos clorados en las zonas húmedas (ALBERS *et al.*, 1986; RYAN *et al.*, 1986; BRYAN *et al.*, 1987; STRUGER *et al.*, 1993) especialmente por las grandes concentraciones de compuestos organoclorados que se han encontrado en varios ejemplares de esta especie (RYAN *et al.*, 1986; STRUGER *et al.*, 1987).

Se ha demostrado que en individuos adultos de tortuga mordedora la concentración de organoclorados es mayor en los tejidos con mayor contenido lipídico (ALBERS *et al.*, 1986; RYAN *et al.*, 1986). En orden decreciente almacenan contaminantes la grasa, huevos, cerebro, hígado, riñón, músculo, páncreas, y pulmón (BRYAN *et al.*, 1987).

La hipótesis de que las tortugas más viejas o aquellas de mayor talla o masa producirían los huevos más contaminados con compuestos organoclorados no es sostenida por BISHOP *et al.* (1994). Alternativamente, parámetros ecológicos o fisiológicos como la variación en las áreas de alimentación y/o las preferencias en la dieta y metabolismo pueden ser posibles determinantes en la variedad de los niveles de contaminación entre los clusters. Entre las mencionadas, para especies omnívoras como son las tortugas mordedoras, la localización y preferencias del alimento podrían ser la mayor influencia respecto a la acumulación de contaminantes (BISHOP *et al.*, 1994).

La importancia toxicológica de la concentración de organoclorados medidos en tejidos de tortugas es difícil de confirmar debido a la falta de dosis tóxicas como referencia. En tortugas de ambientes acuáticos, concretamente en *Chelydra serpentina*, BISHOP *et al.* (1991) publicaron que niveles de PCBs dentro de un rango de 52-72 µg/kg de peso húmedo ocasionaron la disminución de éxito en el nacimiento, aumentaron la incidencia de deformidades en las crías y el número de tortugas enfermas y causaron desorientación entre los individuos.

Los primeros estudios realizados midieron la concentración de compuestos organoclorados en huevos de tortugas y en los primeros estadios de vida en los que son más susceptibles a los efectos tóxicos de los químicos (HERBERT *et al.*, 1993; BISHOP *et al.*, 1994, 1996). Estos estudios sugieren una importante correlación entre la concentración de organoclorados en el hígado de las tortugas y los huevos, indicando

que un examen de los niveles de contaminación en el tejido hepático puede proveer información sobre los contaminantes en los huevos (HERBERT *et al.*, 1993). Basándose en este supuesto, y en el estudio realizado por MEYERS-SCHÖNE & WALTON (1994), que igualmente afirman que la concentración detectada en el hígado de las tortugas debería ser similar al que se encuentre en los huevos, KANNAN *et al.* (2000) midieron la concentración de pesticidas en tejidos de tortuga mapa de manchas amarillas (*Graptemys flavimaculata*) del río Pascagoula (Mississippi), con un resultado en la concentración de *p,p'*-DDE menor a la tasa a la cual se podría ver afectada la supervivencia de las crías. Sin embargo, un reciente estudio examinó la exposición de huevos de tortuga de orejas rojas (*Trachemys scripta elegans*) a organoclorados junto a otros contaminantes obteniendo una importante reversión en el sexo de los individuos comparado con aquellos otros que fueron incubados bajo el único efecto de los compuestos organoclorados, lo que sugiere efectos interactivos potenciales de los diferentes organoclorados (WILLINGHAM & CREWS, 1999). De la misma forma, si en algunos casos no resulta posible relacionar las muertes de tortugas con los niveles corporales de compuestos organoclorados, es razonable suponer que tales compuestos en sinergia con otros contaminantes como metales, bolsas plásticas, vidrio, podrían alterar la fisiología normal de los individuos (KANNAN *et al.*, 2000).

BERGERON *et al.*, (1994) demostraron la actividad estrogénica de algunos PCBs utilizando para ello huevos de tortugas acuáticas (*Trachemmys scripta*) como ejemplo de reptiles dependientes de la temperatura para la determinación sexual. Se ha demostrado que en esta especie a temperaturas de incubación elevadas, (ej. 31°C) todas las crías resultan hembras, a temperaturas inferiores (ej. 26°C) todos son machos, y a temperaturas intermedias (entre 29°C y 30°C) se da una variedad entre machos y hembras (WIBBELS *et al.*, 1991). En esta especie la aplicación de estrógenos exógenos a los huevos durante el período de diferenciación sexual puede contrarrestar los efectos de la temperatura en la formación de machos e inducir el desarrollo de las gónadas femeninas (CREWS *et al.*, 1991; WIBBELS *et al.*, 1992). En el estudio de BERGERON *et al.* (1994), comparando las ratios de sexos se observó que dos componentes, el 2,4,6-tricloro-4-bifenilo y el 2,3,4,5-tetracloro-4-bifenilo produjeron reversión de manera significativa en el sexo de los machos (Test de Fisher,  $p < 0.001$ ) en huevos sometidos a una temperatura de 26°C, específica para la obtención de machos. Al combinar ambos productos resultó en un aumento significativo en el desarrollo de los ovarios a dosis muy inferiores a las iniciales, de 10 µg, o menos de 1 ppm. (Test de Fisher  $p < 0.01$ ),



aproximadamente diez veces inferior a las necesarias para causar la reversión con los productos por separado (BERGERON *et al.*, 1994). En los tests realizados sobre tejido de ratón, los mismos componentes mostraron una apreciable afinidad por los receptores estrogénicos, debido en parte a sus propiedades conformacionales como sustancias hidroxibifenilos (KORACH *et al.*, 1988; MCKINNEY *et al.*, 1990). Como otros metabolitos de los PCBs, los PCBs hidroxilados como los anteriormente mencionados pueden existir en concentraciones estables en el medio marino, quedando los organismos que lo habitan expuestos potencialmente a sus efectos a través de la vía directa, por contacto, o a través de la cadena trófica (MCKINNEY *et al.*, 1990).

A pesar de que se han recomendado los huevos y órganos de la especie *Chelydra serpentina serpentina* como monitores de la concentración de organoclorados en zonas húmedas (ALBERS *et al.*, 1986; RYAN *et al.*, 1986; BRYAN *et al.*, 1987a,b; STRUGER *et al.*, 1993), existen muy pocas investigaciones sobre la dinámica de la acumulación de organoclorados por estos reptiles o la variación de contaminación entre los huevos dentro de los clusters (BISHOP *et al.*, 1995). La variación de contaminación intra clusters ocurre en huevos de aves (MINEAU, 1982; NISBET, 1982) lo que debería de ser considerado para comparar las concentraciones de contaminantes en los huevos de tortugas entre muestras de distintas localidades y años de recogida. BISHOP *et al.*, (1995) realizaron un estudio en el que determinaron los niveles de hidrocarburos clorados entre huevos de tortugas mordedoras pertenecientes al mismo cluster. Además el estudio incluyó la medida de concentración de estos contaminantes en huevos, embriones y crías con el fin de entender mejor la acumulación de estos compuestos durante el desarrollo. La concentración de la mayoría de los compuestos organoclorados no varió de forma significativa entre los huevos dentro de los clusters. Los organoclorados se absorbieron durante el desarrollo, alcanzando el pico de concentración justo antes del nacimiento, aunque no hubo una relación consistente con el aumento corporal y la masa grasa del embrión. En el mismo se observó cómo durante el período postnatal la concentración de contaminantes disminuyó en los recién nacidos respecto a los huevos en la ovoposición. El estudio se centró en el período embrionario, incluyendo el período de organogénesis y desarrollo de tejido muscular y esquelético (CARLSON & DUBY, 1973), en los que se expone el embrión a los tóxicos en un momento de compleja actividad bioquímica y extensa proliferación celular. Este es también el momento en el que el PCB causa los mayores impactos sobre los embriones de las aves. En la especie *Gallus gallus*, la inyección de Aroclor 1242 y 1260 en los huevos previamente a la

formación de los órganos aumentó la mortalidad, pero la inyección tras la organogénesis no tuvo efecto sobre el éxito de nacimientos (CARLSON & DUBY, 1973). En tortugas mordedoras, BISHOP *et al.* (1995), observaron una correlación entre el aumento de la tasa de deformidades y la disminución de nacimientos y la concentración de compuestos organoclorados, especialmente de PCBs (BISHOP *et al.*, 1991), lo que sugiere que la fase más sensible en las tortugas es similar a la observada en aves.

Las serpientes son animales estrictamente carnívoros y pueden llegar a contaminarse con concentraciones ambientales relativamente altas de metales pesados (HOPKINS *et al.*, 1999) e hidrocarburos organoclorados, incluyendo los pesticidas organoclorados (MEEKS 1968; FLEET *et al.*, 1972), bifenilos policlorados (BISHOP & GENDRON, 1998), y dioxinas policloradas (SABOURIN *et al.*, 1984). Los pesticidas organoclorados se han relacionado con muertes (GEORGE & STICKEL 1949; KOEMAN *et al.*, 1978) y el descenso de la población de serpientes en el Sur de los Estados Unidos (FLEET *et al.*, 1972; FLEET & PLAPP, 1978). Los efectos de los PCBs no se han medido en serpientes, aunque artículos anecdóticos indican que serpientes cautivas expuestas a aguas contaminadas por PCBs han resultado muertas (WOJCIK *et al.*, 1995). Los PCBs no se han medido en serpientes silvestres de ninguna localidad durante los años 90, a pesar de la persistencia natural de estos compuestos y sus efectos adversos en otras especies de vertebrados, entre los que se encuentran los reptiles (GILBERTSON *et al.*, 1991; WREN *et al.*, 1991; BISHOP *et al.*, 1998). BISHOP & ROUSE (2000) estudiaron la concentración de 59 congéneres de PCBs y 14 pesticidas organoclorados en el plasma sanguíneo de serpientes acuáticas del norte (*Nerodia sipedon sipedon*) y serpientes del Lago Erie (*Nerodia sipedon insularum*), en Canadá, en peligro de extinción. Para asegurar el potencial de estas serpientes en metabolizar los hidrocarburos policlorados, se compararon los niveles de PCBs de las serpientes con los detectados en el plasma sanguíneo de la tortuga mordedora, huevos de gaviota (*Larus argentatus*) y salamandra acuática (*Necturus maculosus*) recogidos también en los Grandes Lagos. Los resultados mostraron diferencias entre ambas especies de serpientes debido probablemente a los distintos niveles de exposición a los contaminantes en sus dietas. La concentración de PCBs en las serpientes fue similar a la encontrada en las gaviotas, seguida por la de las tortugas. Se sugirió que al igual que la gaviota, la serpiente acuática se ve expuesta a los contaminantes a través de la dieta que puede incluir pequeños peces y anfibios (KING 1986, 1993). Respecto a otros contaminantes, obtuvieron un ratio DDE/PCB inferior a 1.0 lo que generalmente es indicativo en tejido de animales de una dieta

predominantemente acuática (HUGHES *et al.*, 1998). En los huevos de salamandras acuáticas los niveles de PCBs fueron muy inferiores respecto a las restantes especies (BISHOP & ROUSE, 2000).

## 2.5 ORGANOCOLORADOS EN TORTUGAS MARINAS

El grado de concienciación global por la disminución de los tamaños poblacionales de las tortugas marinas está aumentando. La contaminación potencial de sus hábitats y el crecimiento desmesurado no sostenible de la actividad humana, como la recogida furtiva de huevos, la modificación de los nidos de puestas y la captura de ejemplares adultos, son algunos de los factores responsables de la disminución de la especie (SHABICA 1981; GRAMENTZ 1988; HUTCHINSON & SIMMONDS 1991; BONIN *et al.*, 1995). En respuesta a esta conciencia se han establecido una serie de cotos o de reservas marinas a lo largo de las costas en las que se llevan a cabo la puesta de huevos, como Playón de Mexiquillo, en Méjico, así como se han elaborado una gran variedad de estudios en demanda del conocimiento necesario sobre las amenazas que sufren las tortugas marinas en afán de mejorar su protección (VÁZQUEZ *et al.*, 1997).

La extensa revisión sobre contaminantes ambientales en tortugas llevada a cabo por MEYERS-SCHÖNE & WALTON (1994) incluye fundamentalmente información referida a especies de agua dulce. Los estudios detectaron una concentración media de organoclorados en tortugas mordedoras (*Chelydra serpentina*) del río Hudson, de 2990 µg/g en su tejido adiposo. Las altas concentraciones de clorobifenilos y pesticidas organoclorados en huevos de esta especie se han correlacionado con efectos

poblacionales tales como disminución del éxito de incubación, aumento de deformidades en las crías y desorientación (BISHOP *et al.*, 1991, 1994).

Se han realizado no obstante, pocos estudios sobre la concentración y bioacumulación de organoclorados en tortugas marinas (MCKENZIE *et al.*, 1999). En los primeros estudios publicados sólo se proporcionaba la concentración total de los clorobifenilos, sin dar información acerca del perfil de sus congéneres (KAMRIN & RINGER, 1996).

Las fuentes principales de contaminación incluyen desde presas contaminadas hasta la ingestión accidental de sedimentos durante su alimentación bentónica. La presencia de hidrocarburos clorados en el sedimento y en la vida bentónica ha sido ampliamente documentada en diversas áreas frecuentadas por las tortugas como por ejemplo, la Bahía de Chesapeake (HALE, 1988; MOTHERSHEAD *et al.*, 1991).

Las mayores concentraciones de organoclorados en un gran número de especies de tortugas se encontraron en la grasa subcutánea, seguida por el hígado, riñón y músculo pectoral (MARTINEAU *et al.*, 1987; HALE *et al.*, 1991; BERNHOFT & SKAARE, 1994; RYBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1999). La grasa subcutánea contiene la mayor cantidad de contenido lipídico y porcentaje de triglicéridos (expresado sobre el total de lípidos). En contraste, el músculo pectoral presenta el menor contenido de lípidos y triglicéridos y el mayor nivel de lípidos polares, presentando las concentraciones más bajas de organoclorados entre los tejidos analizados (RYBITSKI *et al.*, 1995). En una serie de estudios previos se demostró una fuerte correlación entre el contenido total de lípidos y la polaridad de los lípidos tisulares y su afinidad a los tóxicos lipofílicos (BOER, 1988; KAMMANN *et al.*, 1990). Aunque las gónadas presentan un mayor porcentaje de lípidos frente al músculo (LUTCAVAGE & MUSICK, 1985), muchas de las tortugas que se analizan son aún juveniles y la pequeña cantidad de tejido gonadal con el que se cuenta es insuficiente para realizar los análisis necesarios. Por ello se considera que la grasa subcutánea debe ser el tejido a elegir para la detección de los organoclorados en tortugas marinas (RYBITSKI *et al.*, 1995).

El principal grupo de organoclorados detectado en la mayoría de los estudios realizados sobre tortugas fueron los PCBs. La concentración varía entre las diferentes especies de tortugas marinas y las áreas geográficas que frecuentan. Los mayores niveles detectados en tortugas bobas se dieron en Virginia, al norte de Carolina (USA) con un rango que oscilaba entre 55-1730 ppb en el tejido adiposo, entre 8.3-514 ppb en el hepático, <2 ppb en músculo, y 4.8 ppb en riñón (RYBITSKI *et al.*, 1995). MCKENZIE

*et al.* (1999) detectaron niveles de 775-893 ppb en grasa, 50-102 ppb en hígado, 49 ppb en hígado y 26 ppb en riñón de tortugas bobas en Grecia.

Entre los PCBs, los principales congéneres observados fueron aquellos que van desde los penta a los heptaclorobifenilos, constituyentes de diversas mezclas de Aroclor 1260, una fórmula de PCB que contiene el 60 % de cloro respecto a su peso. El Aroclor 1260 fue en el pasado una de las mezclas comerciales usadas durante más tiempo en los países europeos, y actualmente se usa aún como estándar de referencia para muestras biológicas de esas áreas. En un estudio de CORSOLINI *et al.*, (2000) se compararon los resultados obtenidos en tejidos de tortugas boba con el Aroclor 1260, y se confirma un enriquecimiento de los PCBs altamente clorados. Ello se debe a su estabilidad química ya que no son fácilmente metabolizados por el organismo por la falta de átomos de hidrógeno en las posiciones vecinales, requerimiento necesario para producir el metabolismo oxidativo (BOON *et al.*, 1994). Como consecuencia de lo anterior se tiende a la biomagnificación en las cadenas tróficas. El mismo proceso podría explicar la alta concentración de PCBs poco clorados en el músculo respecto al Aroclor 1260 obtenida por CORSOLINI *et al.*, (2000), debido a la probable mayor afinidad de estos compuestos por los componentes lipídicos del músculo frente a los restantes tejidos analizados. Se cree que las tortugas pudieran tener un sistema enzimático específico capaz de metabolizar los congéneres con sustituciones 2,3,4,5 ( como los PCB 170 y 180 ) que se encuentran en sus tejidos como consecuencia de su extensión y persistencia en el ambiente (CORSOLINI *et al.*, 2000). En la mayoría de los estudios realizados, los principales grupos de congéneres detectados fueron, principalmente el 153(153/132), seguidos por los 138(138/158), 118, 180 y 187 (BOON & EIJGENRAAM, 1988; MUIR *et al.*, 1988; GAGNON & DODSON, 1990; LAKE *et al.*, 1994; RYBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1999; CORSOLINI *et al.*, 2000). El congénere 118, un congénere relativamente coplanar con una sustitución sencilla orto cloro, tiene una fuerte inducción enzimática y potencial toxicidad de gran interés y preocupación (MCFARLAND & CLARKE, 1989). Los congéneres 138, 153, 180 y 187 llevan al menos dos átomos de cloro orto y por ello, fueron caracterizados por SAFE (1990) como menos tóxicos. Sin embargo, estos mismos congéneres se encuentran entre los identificados por MCFARLAND & CLARKE (1989) como los 36 congéneres más importantes desde el punto de vista ambiental basándose en su toxicidad potencial, prevalencia y abundancia relativa en el tejido animal. Estos autores clasificaron los 118 y 138 como los más dañinos biológicamente debido a su inducción sobre el sistema enzimático oxidasa de

función mixta. Los congéneres 153, 180 y 187 se identificaron como menos tóxicos, pero de gran importancia también, debido a su prevalencia en el ambiente.

El análisis del DDT y sus isómeros en ejemplares de tortugas muestra que el *p,p'*-DDE o 4,4'-DDE, con un nivel máximo publicado de 1210 ppb en grasa de tortugas bobas de Virginia (USA) (RYBITSKI *et al.*, 1995), representa la mayor concentración en el total de las muestras, más de un 95 % en la mayoría de las muestras (MCKENZIE *et al.*, 1999). Esta proporción es la norma general en la mayoría de los estudios realizados. RYBITSKI *et al.*, (1995) encontraron similar proporción en hígado y grasa subcutánea en todas menos una de las tortugas analizadas. El orden según la concentración hallada de los componentes del DDT en la mayoría de las muestras fue *p,p'*-DDE > *p,p'*-DDT > *p,p'*-DDD (MCKENZIE *et al.*, 1999). Esta concentración es la observada en la mayoría de los grandes depredadores que frecuentan áreas relativamente cercanas a los centros de contaminación de DDT (AGUILAR 1987). El componente *p,p'*-DDE en los tejidos de las diferentes especies de tortugas analizadas por MCKENZIE *et al.*, (1999) fue proporcionalmente mayor al de otras especies marinas analizadas según datos de la costa este de los Estados Unidos para *Caretta caretta* y *Lepidochelys kempii* (LAKE *et al.*, 1994; RYBITSKI *et al.*, 1995). Como se observa para el caso de los demás organoclorados las mayores concentraciones halladas se localizaron en el tejido adiposo (RYBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1999).

Los compuestos orgánicos clorados acceden a los tejidos de las tortugas marinas mediante la dieta y la reproducción, por transferencia de las hembras a los huevos. El grado de bioacumulación de tales contaminantes depende de la posición en la cadena trófica ocupada por una especie de tortuga, su hábitat y la localización geográfica de los individuos (MCKENZIE *et al.*, 1999), así como del estado de salud del individuo (BERNHOF & SKAARE, 1994).

CLARK & KRYNITSKY (1980) detectaron clorobifenilos en huevos de tortugas bobas y verdes y obtuvieron para tortugas bobas un rango de 32 a 201 µg/kg y niveles inferiores en el caso de las verdes. Las tortugas bobas de la costa este de Florida contienen aproximadamente menos de 5.0-133 µg/kg de equivalente de Aroclor en sus hígados mientras que las verdes de las mismas áreas presentan en hígado un rango de menos de 5.0-70 µg/kg del mismo equivalente (MCKENZIE *et al.*, 1999). Una mayor concentración de PCBs en tortugas bobas respecto a tortugas verdes del Mediterráneo queda también reflejada en el estudio llevado a cabo por MCKENZIE *et al.*, (1999). Las diferencias de concentración entre tortugas bobas y verdes ya han sido publicadas

anteriormente, presentando las tortugas bobas concentraciones consistentemente mayores en músculo, hígado y huevos que las verdes (HILLESTAD *et al.*, 1974; THOMPSON *et al.*, 1974; CLARK & KRYNITSKY, 1980; MCKIM & JOHNSTON, 1983).

En 1999, MCKENZIE *et al.*, también detectaron mayores niveles de organoclorados en las tortugas bobas del Atlántico que en las tortugas laúd de la misma región.

Es bastante común detectar diferentes niveles de organoclorados en las distintas especies de tortugas marinas. De manera general, los ejemplares de *Caretta caretta* acumulan mayores niveles que los de la especie *Chelonia mydas* y *Dermochelys coriacea* (GODLEY *et al.*, 1998). Para el caso de esta última hay que destacar dos motivos principales que probablemente actúan conjuntamente en disminuir la posible exposición a los contaminantes en esta especie. En primer lugar, los hábitos pelágicos de ésta durante todo su ciclo vital respecto a las restantes, que sólo frecuentan estos ambientes durante las migraciones que llevan a cabo, ocupando el resto de sus vidas, ambientes más cercanos a las costas (neríticos), donde los niveles de contaminantes son mayores que en mar abierto. En segundo lugar y motivo que comparte con la especie *Chelonia mydas*, el tipo de dieta.

En el ciclo vital de las diferentes especies de tortugas marinas existen bastantes similitudes (MUSICK & LIMPUS, 1997). Tras la incubación y salida de los huevos en la playa natal, las tortugas marinas pasan por una fase pelágica poco conocida, en la que se piensa se alimentan de plancton durante algunos años. Seguidamente migran durante su desarrollo juvenil a un hábitat, generalmente nerítico donde permanecerán hasta alcanzar el estado adulto. Es durante esta fase post-pelágica cuando las especies parecen desarrollar un importante grado de especialización en sus dietas (FERRI, 1999).

Las preferencias en la dieta de cada especie de tortuga marina muestran marcadas diferencias y han sido analizadas recientemente (BJORNDAL, 1997). Las tortugas bobas, aunque son omnívoras, son principalmente carnívoras, a base de invertebrados bentónicos de manera principal, como se ha visto en un estudio llevado a cabo en dos individuos del este del Mediterráneo, donde se encontraron crustáceos y moluscos bentónicos como base de su dieta general (GODLEY *et al.*, 1997). Las tortugas laúd son las más pelágicas de las especies estudiadas y su dieta consiste casi exclusivamente en medusas y otros organismos gelatinosos. Esta particular especialización de la dieta hace que aun siendo organismos predadores, se vean menos expuestas a los diferentes tóxicos medioambientales por estar su fuente de alimentación



en uno de los niveles más inferiores de la cadena trófica, evitando así los altos niveles de contaminantes por el efecto de la biomagnificación. Los individuos más jóvenes de las tortugas verdes son omnívoros, pero al llegar a la edad madura se vuelven herbívoros, alimentándose principalmente de algas, lo que permite una menor exposición a los diferentes tóxicos al evitar mayores concentraciones a causa de la biomagnificación (GODLEY *et al.*, 1998).

Son numerosos los especímenes de tortugas bobas encontrados muertos en las costas de los mares Adriático, Báltico y Mar del Norte (TOSCANO *et al.*, 1995) siendo altamente susceptible a los cambios ambientales acaecidos por la actividad humana debido a su conducta y sus hábitats reproductivos y de alimentación. Por su tipo de dieta omnívora pueden llegar a ingerir sustancias sintéticas liberadas al mar que pueden resultar altamente tóxicas. Tal es el caso de los plásticos, aceites, petróleo, etc., cuya ingesta expone a las tortugas marinas a la gran variedad de compuestos xenobióticos que los componen, siendo en su mayoría compuestos hidrocarbonados clorados. Las bolsas de plástico son elementos peligrosos para especies como ésta y la tortuga laúd, que las suele ingerir por su gran parecido a las medusas. Al ingerirlas se pueden repartir por los tractos digestivo y respiratorio causando la muerte por asfixia. Además, su composición puede ser altamente tóxica para la mayoría de los organismos del ecosistema marino (CORSOLINI *et al.*, 2000).

El nivel de organoclorados en tejidos de tortugas bobas y golfinas del Atlántico oscila entre 2.86-1730 µg/kg en grasa subcutánea y entre el nivel inferior de cuantificación-608 µg/kg en hígado (RYBITSKI *et al.*, 1995). Este alto grado de variación puede atribuirse a varios factores. La condición del animal y la exposición pueden afectar el contenido de organoclorados en los tejidos. En la mayoría de los estudios realizados el estado de las tortugas a analizar varía ampliamente, desde individuos emaciados tras largos períodos de enfermedad y/o inanición hasta tortugas aparentemente sanas en óptimas condiciones que han sido accidentalmente afectadas por la interacción humana. GEYER *et al.* (1994) demostró que el gran factor biótico que influye en la toxicidad de los contaminantes químicos lipofílicos es el contenido lipídico del organismo. Animales con altos contenidos de grasas pueden acumular y tolerar mayores concentraciones de estos contaminantes químicos, debido a que son almacenados en el tejido adiposo resultando menos accesibles a órganos y receptores. Por el contrario, aquellos organismos emaciados que necesitan movilizar sus reservas de grasas se someten casi inevitablemente a los efectos tóxicos como resultado de la

movilización de los contaminantes. Ello puede resultar en un aumento de la concentración de los organoclorados más clorados, los congéneres de PCBs menos biodegradables, en el tejido adiposo remanente (BERNHOF & SKAARE, 1994). La exposición de los individuos también varía según las distancias recorridas durante la migración. Las especies *Caretta caretta* y *Lepidochelys kempii* en la Bahía de Chesapeake se han visto migrar desde el sur del Cabo Hatteras en primavera. Regresan al sur una vez la temperatura del agua desciende aproximadamente a unos 18 °C (LUTCAVAGE & MUSICK, 1985; KEINATH *et al.*, 1987). Aunque estas especies pueden congregarse en el mar o en el área de las playas de puestas, no existen evidencias de que la migración se realice en grupos. Se han avistado tortugas bobas marcadas en la costa sureste de Estados Unidos en el noreste de Estados Unidos y Golfo de Méjico, así como en las Bahamas, República Dominicana, Cuba, Yucatán y Belice (DODD, 1988). Esta amplia diversidad de hábitats conduce inevitablemente a diferencias en la exposición, pues algunas tortugas se alimentan en áreas contaminadas mientras otras lo hacen en áreas prácticamente vírgenes, siendo la ingestión la ruta más probable de exposición a los contaminantes para estas tortugas (CORSOLINI *et al.*, 2000).

En el estudio llevado a cabo sobre tortugas verdes por MCKENZIE *et al.* (1999) se establece la relación entre la longitud curva del caparazón (LCC) y la concentración total de PCBs y *p,p'*-DDE encontrada en el tejido hepático. Se observa una reducción de la concentración de los contaminantes con el aumento de la talla con una significación estadística de  $r = 0.44$ ,  $p < 0.05$  para PCB y de  $r = 0.84$ ,  $p < 0.001$  para *p,p'*-DDE. Los niveles de residuos en los tejidos son mayores probablemente cuando las crías de tortugas verdes son primeramente recluidas en el hábitat de desarrollo juvenil (MUSICK & LIMPUS, 1997). La inspección del contenido digestivo realizada por GODLEY *et al.* (1997) demuestra que el total de las tortugas se alimentaron exclusivamente de algas en los momentos anteriores a su muerte. Anterior a esta etapa se cree que pasan por una fase omnívora pelágica situándose en niveles superiores de la cadena trófica. La principal acumulación de organoclorados podría darse en esta etapa de vida pelágica y ser subsecuentemente diluida según el animal crece y se encuentra en el estado herbívoro (MCKENZIE *et al.*, 1999). Estos resultados difieren con las observaciones realizadas en especies omnívoras como las tortugas mordedoras de agua dulce en las que se obtiene una correlación positiva entre la concentración de contaminantes en tejido muscular con la longitud del caparazón (MCKENZIE *et al.*, 1999). Los congéneres

de PCBs más lipofílicos fueron los que presentaron una mayor correlación con la edad para la misma especie de tortuga (HERBERT *et al.*, 1993).

El análisis de residuos de contaminantes químicos en huevos de tortugas marinas ha tenido una respuesta global (STONEBURNER *et al.*, 1980; CLARK & KRYNITSKY, 1985; BLUMTON *et al.*, 1990; BISHOP *et al.*, 1991; SAKAI *et al.*, 1995; VÁZQUEZ *et al.*, 1997; ALAM & BRIM, 2000) y existe la necesidad de cuantificar la concentración de contaminantes en un esfuerzo para conservar la población de tortugas marinas. A principios de 1990 se observó que muchos huevos puestos a lo largo de la costa noreste de Florida no llegaron a eclosionar. Junto a otras posibles causas, existe la hipótesis de que los contaminantes químicos sean una razón potencial para el fallo del desarrollo (ALAM & BRIM, 2000). En el estudio realizado por ALAM & BRIM (2000) sobre huevos de tortugas bobas a lo largo del noroeste de Florida detectaron entre los pesticidas organoclorados niveles de *p,p'*-DDD en un rango de 0.753 y 0.800 µg/g (753-800 µg/kg). Se consideraron las concentraciones obtenidas como bajas para causar efectos adversos en el organismo, concluyendo que los pesticidas organoclorados por sí solos no fueron un factor limitante para la eclosión de los huevos estudiados. Sin embargo, es difícil concretar con precisión el efecto potencial y crónico de los pesticidas organoclorados en los niveles mencionados por la poca información toxicológica existente al respecto (RYBITSKI *et al.*, 1995). CLARK & KRYNITSKY (1980, 1985) obtuvieron concentraciones de DDE en huevos de tortugas bobas de Merritt Island, Florida, en 1980 y 1985 de 0.047 y 0.091 µg/g (47-91 µg/kg), respectivamente. Además de los organoclorados estudiados, ALAM & BRIM (2000) midieron los niveles de PCBs, PAH (hidrocarburos policíclicos aromáticos) y metales. No se encontraron concentraciones que pudiesen alterar el buen funcionamiento del organismo, y los niveles de PCBs, los mayores detectados entre los distintos productos analizados, no excedieron en ningún caso las concentraciones que la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) establece como límite peligroso (2 ppm, por peso de tejido húmedo). De este estudio se concluyó que aparentemente, los huevos de tortugas bobas del noroeste de Florida se encuentran expuestos a una mezcla de contaminantes químicos (ALAM & BRIM, 2000). Las alteraciones en el desarrollo de los huevos puede relacionarse con la toxicidad aditiva o sinérgica de las concentraciones comparativamente bajas de los diversos componentes observados en el estudio (ALAM & BRIM, 2000). LI *et al.* (1999) observaron que los efectos de hidrocarburos policíclicos aromáticos combinados con compuestos altamente tóxicos, poco tóxicos e incluso con

compuestos inactivos, fueron diferentes significativamente respecto a una interacción aditiva sencilla. En otro estudio realizado *in vitro*, KHOLKUTE & DUKELOW (1997) encontraron que una mezcla de PCBs tuvo efectos adversos sobre la fertilización, oocitos y células embrionarias de ratón sin efectos aditivos o sinérgicos. La combinación de algunos contaminantes químicos sinérgicos en organismos acuáticos puede resultar antagónica en otros (TOMASIK *et al.*, 1995); por ello es importante que los efectos sinérgicos y antagónicos de las sustancias químicas sean definidos y ejecutar, a partir de ello, la protección de las especies que a éstos se exponen.

En 1997, COOB & WOOD, en un intento por determinar la concentración de compuestos organoclorados en crías de tortugas bobas sin necesidad de recurrir a un tipo de muestras que impliquen la muerte del ejemplar, realizaron un estudio basado en la comparación de los niveles detectados en las membranas corioalantoideas frente a los detectados en el huevo. Las concentraciones de PCBs en las membranas corioalantoideas resultaron mayor que las observadas en los huevos.

### **2.5.1. EFECTOS DE LOS ORGANOCOLORADOS EN TORTUGAS MARINAS**

Son escasos los estudios científicos publicados acerca de los niveles de organoclorados y sus efectos en reptiles, así como tampoco se han establecido los niveles a partir de los cuales existe un riesgo tóxico considerable. Aunque es poco probable que tales contaminantes causen efectos agudos a las concentraciones encontradas en los diversos estudios, se ha relacionado una variante de efectos crónicos con la presencia de éstos (RYBITSKI *et al.*, 1995).

Los niveles de organoclorados en el ecosistema podrían afectar considerablemente a la población de tortugas marinas incidiendo en el éxito reproductivo de los individuos. Sin embargo, el foco principal de la mayoría de los estudios de laboratorio al respecto se han basado en la exposición directa y los potenciales efectos tóxicos agudos detectados (O'SHEA & BROWNELL, 1994).

No existe una evidencia directa que implique a los organoclorados en la mortalidad o en el fallo reproductivo de las tortugas marinas. La relación entre ambos se basa en estudios realizados en laboratorio en los que el método de administración y las dosis requeridas para la aparición de efectos adversos puede no reflejar la realidad que se da en el medio natural (O'SHEA & BROWNELL, 1994). Las tortugas marinas como

cualquier otro organismo de vida libre, están sujetas a diferentes fuentes de estrés ambiental y complejas mezclas de diferentes tóxicos que no se reflejan en los estudios de laboratorio. Este estrés puede aumentar potencialmente los efectos de los contaminantes mediante factores de interacción (PORTER *et al.*, 1984). Por otro lado, las poblaciones del medio natural pueden presentar mayor vigor y resistencia que las tortugas mantenidas en cautividad.

La muerte por compuestos organoclorados se da por acción directa sobre el sistema nervioso. El diagnóstico de muertes basado en la concentración de residuos en tejidos se menciona únicamente para el caso del cerebro (STICKEL, 1973; CLARK, 1981). Las concentraciones de tóxicos detectadas en tejidos cerebrales varían con las especies, pero dentro de un mismo orden de magnitud. De los compuestos organoclorados comúnmente descritos en diferentes especies, el orden decreciente general de toxicidad es DDT > DDE > PCBs. Para el DDT, los valores de concentración residuales detectados en tejidos cerebrales de mamíferos han consistido en 45 ppm (45000 ppb) en ratas de laboratorio (DALE *et al.*, 1963; HAYES, 1965; HENDERSON & WOOLLEY, 1969; CLARK, 1981), 50 ppm (50000 ppb) en ratones de laboratorio (GINGELL & WALLCAVE, 1974) y 25 ppm (25000 ppb) en murciélagos marrones pequeños (*Myotis lucifugus*) (CLARK *et al.*, 1981). Tales concentraciones son similares a las descritas en aves (STICKEL, 1973). Para el DDE, las concentraciones letales en cerebro han sido establecidas en 519 ppm (519000 ppb) en murciélagos de cola suelta de bolsa, *Tadarida brasiliensis* y *Nyctinomops femorosaccus* (CLARK & KROLL, 1977); y 300-400 ppm (300000-400000 ppb) en cuatro especies de aves (STICKEL *et al.*, 1984a). Las concentraciones de PCBs en cerebro y que resultan letales aparecen en torno a los 1400 ppm (1400000 ppb) (CLARK & STAFFORD, 1981). Sin embargo, hay que destacar que los PCBs aparecen en mayores niveles en la dieta y pueden ser también letales de un modo no neural, en cuyo caso, las concentraciones a nivel cerebral pueden no ser detectadas (STICKEL, 1975). Con todo esto, debemos tener en cuenta que la concentración en el tejido cerebral depende de la compleja interacción relacionada con el almacenaje y excreción de organoclorados en los tejidos, su movilización por el organismo y otros factores a considerar (O'SHEA & BROWNELL, 1994).

Una vez en el interior del organismo, los DDT, PCBs y sus metabolitos pueden afectar el sistema endocrino, con consecuencias sobre el crecimiento, desarrollo, y reproducción (OESTREICHER *et al.*, 1971; GUILLETTE *et al.*, 1994; FACEMIRE *et al.*, 1995). El estado embrionario parece ser la fase de desarrollo más vulnerable a los

efectos de contaminantes que alteran el sistema endocrino (GUILLETTE *et al.*, 1995). Se ha demostrado que el desarrollo anormal, deformidades congénitas, aumento de la mortalidad, y bajo éxito en la eclosión de los huevos ocurren a causa de la contaminación por DDE en una variedad de organismos entre la que se encuentran los reptiles (BISHOP *et al.*, 1991; GUILLETTE *et al.*, 1994).

En muchas especies de tortugas la temperatura alcanzada durante la fase de incubación determina el sexo de las crías, no obstante, la implicación de hormonas esteroideas, que juega un papel crucial en dicha determinación, abre la posibilidad de que contaminantes químicos antropogénicos con marcado efecto de disruptor hormonal, puedan influir en el sistema endocrino y, en consecuencia, en el resultado final de la diferenciación sexual. Este hecho se produce con la exposición a compuestos sintéticos como los organoclorados que induce el desarrollo de hembras (PODREKA *et al.*, 1998). ARNOLD *et al.*, (1997) demostraron que cierta combinación de sustancias estrogénicas detectadas en el medio ambiente alteran el sexo de embriones machos de tortugas de manera sinérgica (BERGERON *et al.*, 1994) y sugirieron que la presencia de diferentes metabolitos estrogénicos en embriones de tortugas puede jugar un papel fundamental durante la diferenciación sexual. Tanto el DDT como los PCBs han sido clasificados como estrogénicos basándose en su capacidad para producir los efectos clásicos de estas sustancias en animales (BERGERON *et al.*, 1994; KORACH *et al.*, 1988). Estas evidencias de que los PCBs actúan como sustancias con poder estrogénico pueden clarificar algunos de los desórdenes reproductivos en la diferenciación gonadal de las especies. Son varios los estudios enfocados a relacionar los niveles de organoclorados con el éxito reproductivo de las tortugas (BERGERON *et al.*, 1994). En las tortugas marinas el DDE se acumula en el tejido adiposo (RYBITSKI *et al.*, 1995) y de manera eventual pasa a los huevos (HALL *et al.*, 1979; HERBERT *et al.*, 1993). Se han detectado compuestos organoclorados en huevos de tortugas bobas y verdes (HILLESTAD *et al.*, 1974; THOMPSON *et al.*, 1974; CLARK & KRYNITSKY, 1980) y en crías (MCKIM & JONSON, 1983) en un rango de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a  $\text{mg}/\text{kg}$ . La concentración de DDE en huevos de tortugas y otros reptiles se ha medido en varios estudios, pero el efecto de estos contaminantes sobre los embriones se ha estudiado únicamente en unos pocos trabajos (THOMPSON *et al.*, 1974; BISHOP *et al.*, 1991; HEINZ *et al.*, 1991; GUILLETTE *et al.*, 1994; PODREKA *et al.*, 1998).

PODREKA *et al.*, (1998) estudiaron el efecto del DDE en la diferenciación sexual de la tortuga verde (*Chelonia mydas*), tratando con DDE los huevos recogidos de cuatro

grupos diferentes al principio del período termosensitivo para la determinación sexual. Los diferentes grupos presentaron diferencias significativas, aunque bajas, en la concentración de DDE. Tales diferencias probablemente reflejen la variación en los niveles ambientales de DDE en las áreas frecuentadas por las tortugas hembras (BROWN, 1978), diferencias en el tiempo desde la puesta (KWAN, 1994), o variación natural en la toma de DDE y tiempo de retención de cada individuo (MATSUMURA, 1977). De las dosis administradas de DDE sólo un 34 % se encontró en el interior de los huevos, y un 8 % en los embriones. Se concluyó que los huevos de tortugas verdes sometidos a concentraciones de DDE inferiores a 543 ng/g produjeron crías con relativamente alto éxito en la tasa de supervivencia y diferenciación gonadal normal, pues la proporción por sexos a esta dosis no presentó diferencias respecto al esperado según la temperatura; así como tampoco se vieron afectados los tiempos de incubación, el éxito de nacimientos, la incidencia de deformaciones corporales, la talla de las crías y su peso (PODREKA *et al.*, 1998). Esto contrasta claramente con otros estudios que han descrito disminución en el éxito de nacimientos, aumento de deformidades y modificación en el desarrollo cuando se han expuesto reptiles al DDT y sus metabolitos (BISHOP *et al.*, 1991; GILLETTE *et al.*, 1995). Todas estas aportaciones lo único que revelan es que el rango de niveles del DDE que es capaz de disparar estas respuestas en los embriones es todavía desconocido. En cualquier caso es necesario considerar en todo momento los posibles efectos sinérgicos entre los DDT y sus metabolitos con otros contaminantes que alteren el sistema endocrino sobre la diferenciación sexual (JOBILING *et al.*, 1995; SUMPTER & JOBILING, 1995), así como una posible exposición continua al medio contaminado con DDE durante los períodos de incubación y los efectos transgeneracionales (PODREKA *et al.*, 1998).

Se han revisado en algunas poblaciones de tortugas marinas expuestas a organoclorados los parámetros generales de salud (GEORGE 1997), así como los parámetros sanguíneos en tortugas bobas de la costa este de los Estados Unidos (LUTZ & DUNBAR-COOPER 1987; BOLTEN *et al.*, 1992; GEORGE 1997). Se ha observado que algunos parámetros, como la presión osmótica y la urea, sufren cambios estacionales, pero otros se mantienen relativamente constantes durante todo el año, como la glucosa y el hematocrito (BOLTEN *et al.*, 1992). ALBERS *et al.* (1986) no encontraron alteraciones en el hematocrito y en el análisis bioquímico de tortugas mordedoras con niveles importantes de organoclorados en sus tejidos. Pero en el estudio realizado por KELLER *et al.* (2004) se obtuvo la primera evidencia de que los organoclorados pueden afectar al

estado de salud de las tortugas marinas. Aunque las concentraciones que detectaron de estos tóxicos fueron relativamente bajas comparadas con otras especies, observaron una importante correlación entre los niveles de organoclorados y parámetros generales de salud de diferentes funciones biológicas, como inmunidad y homeostasis de proteínas, carbohidratos e iones.

Entre los posibles sistemas orgánicos afectados por la presencia de organoclorados se encuentra de manera destacada el sistema inmune. La potencial inmunotoxicidad de los compuestos organoclorados ha sido demostrada con los cambios observados en el número de células blancas de la sangre en trabajos de laboratorio con ratones y focas (DE SWART *et al.*, 1995; SEGRE *et al.*, 2002), y con animales de vida libre y humanos expuestos a las condiciones ambientales (GRASMAN *et al.* 1996). También se ha citado un aumento en la proporción heterófilos/linfocitos como indicador de estrés general en pollos (GROSS & SEIGEL 1983) y de enfermedad en tortugas marinas (AGUIRRE *et al.*, 1995; CRAY *et al.*, 2001; WORK *et al.*, 2001). La afectación del sistema inmune por la presencia de organoclorados en tortugas boba (*Caretta caretta*) se demostró por la alteración del número de leucocitos de la sangre y de la ratio heterófilos/linfocitos (KELLER *et al.*, 2004), y por la proliferación de linfocitos que inducen la división celular (mitogénesis) (KELLER *et al.*, 2002).

Son ampliamente conocidos los efectos tóxicos de los PCBs sobre el riñón, y sobre los diferentes parámetros bioquímicos sanguíneos, como el nitrógeno ureico en sangre y el nivel de los electrolitos, que son utilizados para confirmar la disfunción renal (MCCONNELL, 1985). Sin embargo, en las tortugas, el BUN (nitrógeno ureico sanguíneo) es un mal indicador de la alteración renal (CAMPBELL, 1996) y probablemente representa mejor el estado nutricional y el metabolismo proteico. Se ha observado que la concentración de BUN aumenta una media de 50 mg/dl a 122 mg/dl durante la recuperación de heridas o enfermedades en *Caretta caretta* (HARMS *et al.*, 2002). La correlación positiva entre los niveles de nitrógeno ureico en sangre y la concentración de organoclorados en sangre en tortugas bobas podría indicar que aquellas que presentan altos niveles de nitrógeno ureico en sangre han comido recientemente y consecuentemente, se produce un aumento correspondiente en los niveles de lípidos en sangre, capaces de transportar contaminantes lipofílicos. El hecho de que exista una mayor correlación entre el BUN y los niveles de organoclorados en sangre y los niveles en el tejido adiposo refuerzan la conclusión anterior (KELLER *et al.*, 2004). Sería necesario estudiar más detalladamente los niveles de nitrógeno ureico en



sangre, el metabolismo de las proteínas, los lípidos sanguíneos y los niveles de organoclorados en las tortugas marinas para confirmar la posible relación entre ellos.

En el estudio realizado por KELLER *et al* (2004) se detectó una relación entre los niveles de organoclorados y un aumento del contenido en sodio y una disminución en la concentración de magnesio. En peces, la exposición al clordano se tradujo en un aumento de la concentración del sodio y del magnesio (BANSEL *et al.*, 1979). El equilibrio iónico en las tortugas marinas es regulado no sólo por el riñón, sino también por las glándulas excretoras de sal. Las glándulas excretoras de sal de las tortugas bobas concentran el sodio 8 veces más respecto al plasma y al magnesio 45 veces más y excretan el fluido resultante a través de los conductos próximos a los ojos (VARGO *et al.*, 1986). Si el riñón o las glándulas de la sal de las tortugas marinas son sensibles a los organoclorados, como se ha visto en otra especie (MCCONNELL, 1985), la correlación observada por KELLER *et al.*, (2004), podría significar que los organoclorados afectan a estos órganos y al equilibrio iónico de las tortugas marinas.

La concentración de glucosa en sangre está claramente relacionada con el estado nutricional en las tortugas bobas (LUTCAVAGE *et al.*, 1995). La glucosa en el plasma es estrictamente regulada por el hígado y su compleja interacción con el hipotálamo y con la hipófisis y las glándulas adrenales. Por ello, cualquier posible interferencia de los organoclorados en los órganos mencionados podría ser la causa de una alteración de los niveles de glucosa en sangre. En el estudio de KELLER *et al.* (2004) se observó una correlación negativa entre los niveles de glucosa y la concentración de dieldrín y DDTs en el tejido adiposo de tortugas bobas. El mismo resultado se ha obtenido para otras especies de vertebrados, como en el caso de ratas expuestas a PCBs (BOLL *et al.*, 1998; CHU *et al.*, 1994).

También se conoce la alteración de la actividad de las enzimas hepáticas por la presencia de organoclorados, como la fosfoenolpiruvato carboxinasa y la enzima málica, responsables de la regulación de proteínas, lípidos y azúcares (BOLL *et al.*, 1998). En tortugas bobas, valores altos en la concentración de organoclorados se han correlacionado con una disminución del cociente albúmina/globulina (KELLER *et al.*, 2004). Además, en el mismo estudio se obtuvo un aumento de la actividad de la AST (Transaminasa Glutámica Oxaloacética Sérica) y una disminución de la ALP (Fosfatasa Alcalina) en las tortugas bobas con altos niveles de organoclorados. El aumento de la AST se usa comúnmente como indicador de daño hepatocelular en aves y mamíferos expuestos a organoclorados (ARNOLD *et al.*, 1990; FEELEY, 1995). Resulta difícil

interpretar las correlaciones observadas por KELLER *et al.* (2004) entre los niveles de organoclorados detectados y la actividad de las enzimas en plasma por la falta de estudios que determinen la distribución de estas enzimas en los órganos de las tortugas marinas. Si nos basamos en la evidencia experimental de que los organoclorados causan daños en el hígado y consecuentemente producen un aumento de la AST en plasma en mamíferos y aves, es plausible que la fuerte correlación encontrada por KELLER *et al.* (2004) sea un indicativo de daño hepatocelular en tortugas marinas contaminadas por organoclorados. Esta interpretación es reforzada por la ausencia de correlación entre organoclorados y actividad CPK (Creatinquinasa ó Creatinfosfocinasa), enzima de origen muscular. Según CAMPBELL (1996), de un daño hepatocelular se espera que resulte un aumento de la AST, pero no de la actividad CPK.

Todas las correlaciones observadas por KELLER *et al.* (2004) entre los niveles de organoclorados y los diferentes parámetros medidos sugieren que el estado de salud de las tortugas bobas se ve afectada por estos contaminantes. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de los indicadores medidos, incluso para las tortugas con mayores niveles de organoclorados, no rebasaron los rangos establecidos para esta especie. Si bien es cierto que los rangos descritos se han concluido tras el examen de tortugas marinas de vida libre que, indudablemente, han estado expuestas a los ubicuos organoclorados. Además, es posible que pudieran darse efectos adversos en un animal aun cuando sus parámetros se encuentren dentro del rango establecido para la población (KELLER *et al.*, 2004). El hecho de que se hallara una importante correlación aun cuando los niveles de organoclorados detectados fuesen mucho menor que los encontrados para otras especies de animales sugiere que las tortugas marinas podrían ser más sensibles al impacto de los organoclorados de lo que previamente se había sugerido (KELLER *et al.*, 2004).

Entre los metabolitos del DDT, STORELLI & MARCOTRIGIANO (2000) sólo encontraron *p,p'*-DDE. LAKE *et al.* (1994) y MCKENZIE *et al.* (1997) encontraron en tortugas marinas el *p,p'*-DDE presente en las mayores concentraciones ( 85 % y 95 % del total del DDT respectivamente). El DDT, como los demás xenobióticos liposolubles, es metabolizado principalmente por la acción de las enzimas del retículo endoplasmático de las células hepáticas, comúnmente conocidas como enzimas microsomales. El *p,p'*-DDE y otros compuestos organoclorados originan una manifiesta proliferación del retículo endoplasmático liso (ORTEGA, 1966; NORBACK & ALLEN, 1972) y un incremento en la cantidad de pigmentos citocromos microsomales del

hígado esenciales para esa reacción, tales como el citocromo P-450 y la NADPH-citocromo reductasa (GREIM & REMMER, 1966; PARKKI *et al.*, 1977). Esto resulta en una exaltación de la actividad metabolizante de las enzimas microsomales lo que causa un aumento en las concentraciones relativas de los compuestos metabólicos. El DDT se transforma en DDE a través de una deshidrocloración producida por una serie de reacciones de eliminación. Como consecuencia, el DDE comienza a ser progresivamente más abundante, lo que unido a su difícil excreción por su baja polaridad resulta en una clara tendencia del organismo a acumularlo. Por tanto, la presencia exclusiva de este metabolito no resulta sorprendente, existiendo estudios sobre compuestos organoclorados en huevos de tortugas marinas en los que se ha descrito la única presencia del DDE entre los metabolitos del DDT (CLARK *et al.*, 1980, 1985).

La fibropapilomatosis es actualmente una patología que afecta a diversas poblaciones de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) en proporciones epidémicas a nivel mundial. Aunque se ha sugerido un virus como agente causal, se desconoce con certeza la etiología primaria. Los contaminantes químicos que afectan el sistema inmunológico y el estrés se han mencionado entre otros como posibles agentes etiológicos (AGUIRRE, 1991; BALAZS & POOLEY, 1991).

Los contaminantes ocasionan estrés al organismo causando cambios morfofisiológicos como la proliferación celular que llega a ocasionar tumores dérmicos que afectan a organismos acuáticos (GIAM & RAY, 1987). El estrés crónico conlleva una reducción de las energías disponibles para los procesos fisiológicos básicos causando una alteración en la respuesta inmune celular que a su vez deja al organismo más susceptible frente a los agentes infecciosos (AGUIRRE *et al.*, 1994). Los papilomas y otros tumores en peces se han utilizado como índice para detectar carcinomas químicos en el medio marino. No obstante, hay pocos estudios que relacionan este tipo de patologías con la exposición de las tortugas marinas y sus huevos a los contaminantes orgánicos persistentes (HUTCHINSON & SIMMONDS, 1991). AGUIRRE *et al.* (1994) no encontraron correlación entre la fibropapilomatosis encontrada en los tejidos de diez tortugas verdes juveniles y los contaminantes detectados, entre ellos, organoclorados, bifenilos policlorados, organofosfatos, selenio y metales pesados, debido a la baja concentración detectada en dichos tejidos. Los bajos niveles detectados se atribuyeron a los hábitos herbívoros de esta especie de tortuga, ya que las algas marinas resultan

menos susceptibles a la bioconcentración de estos contaminantes (AGUIRRE *et al.*, 1994).

Por último, se ha observado que algunas consecuencias patológicas en las tortugas marinas provocadas por la exposición a contaminantes ambientales persistentes, incluyen alteraciones en la reproducción, alteración en el balance hormonal, bajo éxito reproductivo, e inmunosupresión (AGUIRRE *et al.*, 1994). La posibilidad de que estos compuestos puedan predisponer a los individuos a padecer enfermedades como la fibropapilomatosis está aún en estudio. La investigación de otras especies con fibropapilomas sugiere que la polución química podría activar virus latentes o aumentar de manera indirecta su virulencia (GAMACHE & HORROCKS, 1992). Se ha sugerido un componente inmune mediador a la enfermedad (BALAZS & POLEY, 1991; HUTCHINSON & SIMMONDS, 1991) implicando varios pesticidas como posibles inmunosupresores.



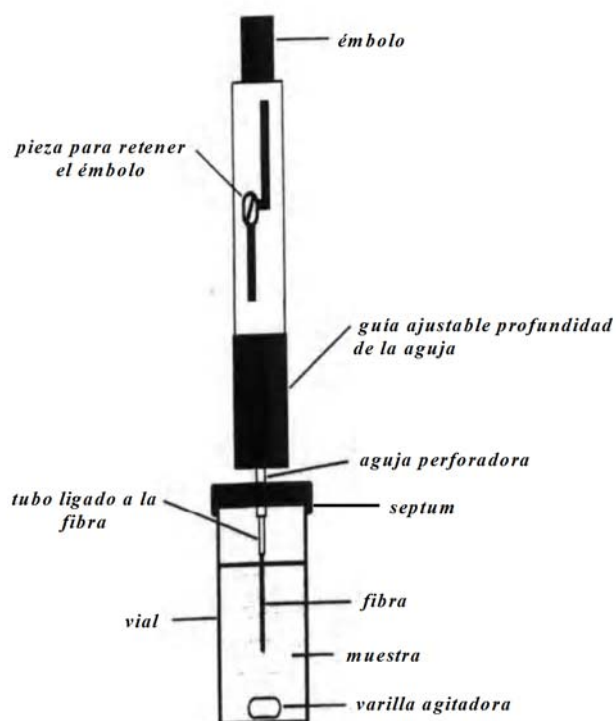
## **2.6 DETECCIÓN DE ORGANOCORADOS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)**

La metodología para la detección de organoclorados a partir de muestras de tejido animal, debido a lo complejo de su matriz, requiere de diferentes pasos analíticos que incluyan una fase de extracción de la grasa del tejido, una elaborada y minuciosa fase de purificación y una fase crítica de concentración de la muestra final previo a ser detectada mediante las diferentes alternativas de detección (TANABE *et al.*, 1984). Ello requiere una enorme cantidad de tiempo y de disolventes orgánicos que por un lado tienden a aumentar el número de errores durante la larga y laboriosa manipulación de las muestras, y por otro lado, conllevan una amenaza medioambiental por la gran cantidad de residuos tóxicos que se utilizan y generan, y que a la vez, suponen un alto riesgo para la salud de aquellos que los emplean.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica alternativa que permite que analitos como los compuestos organoclorados, entre otros, puedan ser extraídos directamente de una solución acuosa. Así, a diferencia de otras técnicas, no se requieren tiempos prolongados para el procesamiento de las muestras, ni grandes cantidades de costosos y perjudiciales disolventes orgánicos (PAWLISZYN, 1997; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001).

En 1989 BELARDI & PAWLISZYN publicaron las primeras aplicaciones de la SPME, obteniéndose el primer sistema en 1990 (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990). En 1993 Supelco comercializó el sistema de SPME basado en una microjeringa reutilizable con fibras recubiertas de un polímero, polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA), para la extracción.

El sistema de SPME consiste en una pequeña fibra de sílice fundida recubierta normalmente de una fase polimérica que se instala sobre un soporte. Ello le confiere cierta semejanza con una jeringa que facilita su manipulación y protege la fibra mientras no sea utilizada (Figura 2.3).



**Fig. 2.3.** Diseño y componentes del sistema de operación de SPME

La fibra queda expuesta a la muestra durante un tiempo de absorción optimizado, normalmente favorecido mediante agitación, en el que los analitos pasan de la fase acuosa de la muestra a la fase adsorbente de la fibra. Transcurrida la etapa de absorción, los analitos son desorbidos térmicamente desde la fibra a la columna capilar del cromatógrafo de gases (CG) directamente a través del puerto de inyección (PAWLISZYN, 1997).

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas convencionales: requiere poco tiempo, poca cantidad de disolventes tóxicos, bajo coste, y puede ser automatizada (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001). El principal inconveniente radica en que debido a la limitada capacidad de las fibras en ocasiones no se obtienen unos límites de detección bajos (PEÑALVER, 2002).

La extracción por SPME se puede llevar a cabo de tres maneras distintas: inmersión directa, extracción con espacio de cabeza y extracción con membrana protectora. La selección del modo de extracción se debe hacer considerando tres aspectos fundamentales: la matriz de la muestra, la volatilidad del analito y su afinidad por la matriz (PAWLISZYN, 1997).

La elección de la fase estacionaria de la fibra se basa principalmente en la polaridad y volatilidad del analito a estudiar. Desde los comienzos de la aplicación de la técnica de SPME ha habido un importante desarrollo en la aplicación de nuevas fibras desarrolladas para SPME/CG (WERCINSKI, 1999). Aunque siguen destacando las fibras de PDMS y PA, actualmente se están investigando tipos de fibras con fases poliméricas más polares y que están siendo recientemente comercializadas, como son CW-DVB, CW-TPR o CX-PDMS (PITARCH, 2001).

En la técnica de SPME se distinguen claramente dos procesos: la absorción o retención de analitos en la fibra, y la desorción. Es necesario la optimización de las variables implicadas en cada proceso para obtener una determinación adecuada de los analitos a estudiar (PAWLISZYN, 1997).

Dentro de las variables que afectan el grado de absorción se encuentran: el tipo de fibra, el tiempo de extracción, la fuerza iónica (contenido en sal), el pH, la temperatura, los efectos de la matriz, el volumen de la muestra, la agitación, la posición de la fibra y la dilatación térmica de la fase polimérica (PITARCH, 2001).

El tiempo de extracción requerido para alcanzar el equilibrio puede variar entre algunos minutos y varias horas, según sean las características del analito y el método de agitación utilizado. Generalmente, la fibra sólo extrae una parte del analito en solución, pero debido a que todo el analito extraído se transfiere a la columna cromatográfica, se suelen obtener límites de detección favorables comparados con otras técnicas convencionales que sólo transfieren una pequeña parte del analito a la columna cromatográfica por los pocos mililitros que se inyectan del extracto final (PEÑALVER, 2002).



La efectividad de la técnica de agitación determina el tiempo de equilibrio de las muestras en solución acuosa. Existen varios modos de aplicar la agitación en SPME. La técnica más común es la agitación magnética, en la que se debe mantener constante la velocidad de rotación de la varilla (GEPPERT, 1998; PROSEN & ZUPANCIC-KRALJ, 1999). Otras alternativas son: la vibración de la fibra, la agitación en vortex, la agitación por flujo y la agitación por ultrasonidos. Los resultados obtenidos a partir de la agitación magnética la convierten en la más utilizada en la mayoría de los estudios realizados (GEPPERT, 1998; PITARCH, 2001).

La fuerza iónica y el pH pueden aumentar el rendimiento de la extracción según las características de la muestra. La concentración de sal adecuada o la disolución tampón se han de añadir directamente sobre la propia muestra (PITARCH, 2001; PEÑALVER, 2002).

El control de la temperatura también es importante ya que afecta a la tendencia de los analitos a estar en una u otra fase y la posibilidad de disminuir el rendimiento de la extracción, por lo que se hace fundamental mantener una temperatura óptima constante que no se vea afectada por el efecto de agitación al que se somete a la muestra (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001, PEÑALVER, 2002).

En la desorción las variables a optimizar son: la temperatura del inyector, el tiempo de desorción y la temperatura inicial del horno. Además debe tenerse en cuenta el uso de un inserto de inyección adecuado y la situación de la aguja, de modo tal que garantice que la fibra se encuentre en el centro de la zona caliente del inyector (PITARCH, 2001).

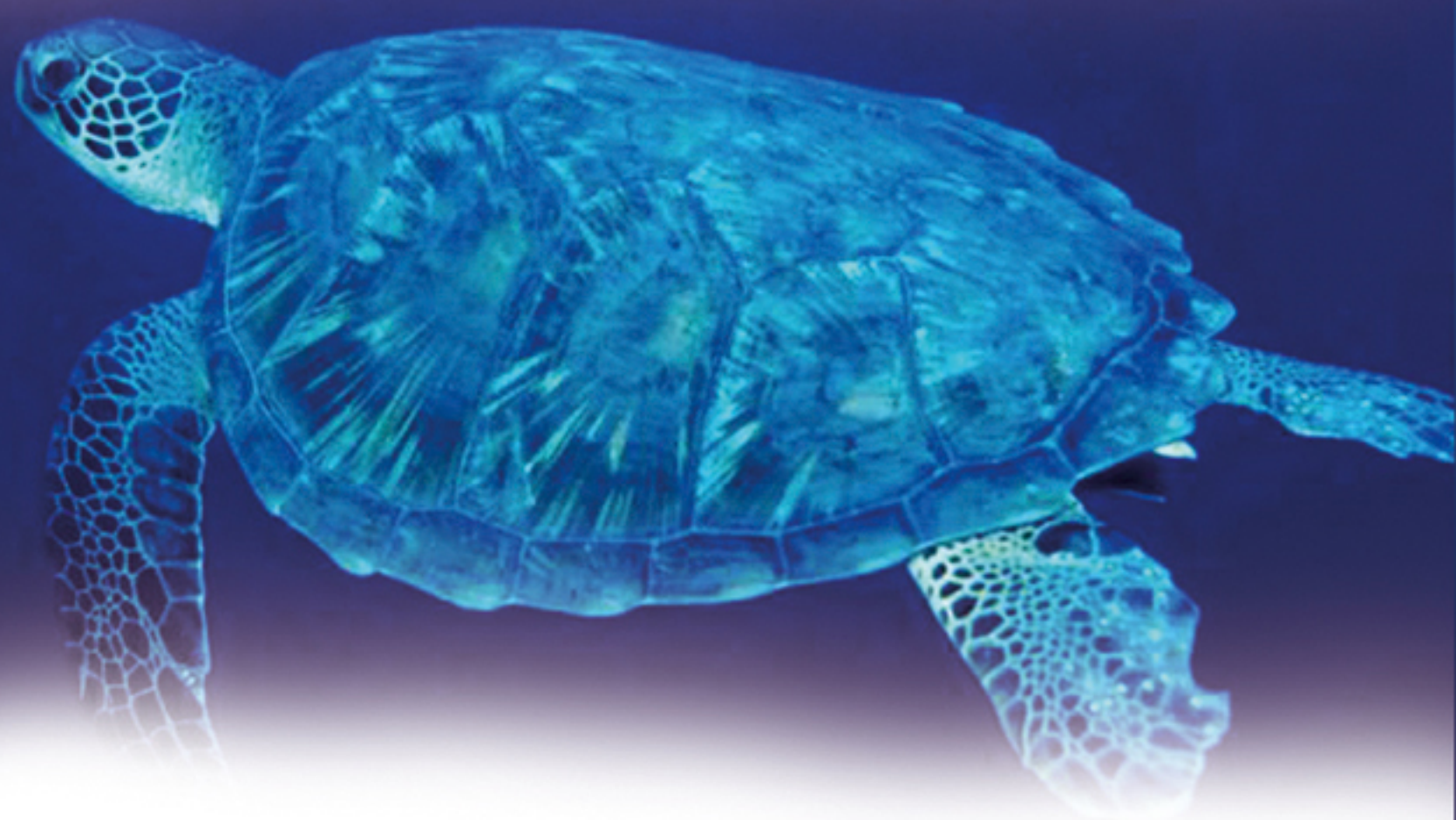
La SPME se ha utilizado satisfactoriamente para el análisis de analitos polares y no polares incluyendo pesticidas organoclorados y organofosforados (PAGE & LACROIX, 1997; SNG *et al.*, 1997). BELTRÁN *et al.* (2000) realizaron una completa revisión de la bibliografía existente considerando las diferentes aplicaciones en diferentes tipos de matrices incluyendo muestras medioambientales (agua y suelo), alimentos (vino, frutas, miel y zumos) y fluidos biológicos (orina, suero y sangre), reconociéndose en algunas de las muestras la necesidad de un pre-tratamiento para simplificar la matriz, o bien reducir el contenido de disolvente orgánico cuando se requiera una extracción previa con disolventes.

Las características de los compuestos organoclorados, principalmente su elevada lipoafinidad, hace que se deba recurrir a muestras ricas en ácidos grasos para una adecuada determinación. Las muestras de tejido adiposo destacan por su alto contenido

en grasa, constituyendo una matriz difícil y compleja de analizar. Esto hace necesario un sistema de purificación eficaz que elimine las sustancias interferentes previamente a la identificación cromatográfica, evitando daños en la columna y la contaminación de los detectores. Además, para que se pueda considerar útil su aplicación en diferentes estudios, es necesario que dicho procedimiento sea razonablemente sencillo, rápido y económico (PITARCH, 2001).

Aunque muchos aspectos sobre la aplicación de la SPME en el análisis de muestras complejas están siendo todavía investigados, se debe considerar esta técnica como una vía alternativa frente a las técnicas de detección convencionales. La conveniencia, simplicidad y fiabilidad de la técnica SPME la convierte indudablemente en una herramienta fundamental para el futuro de la investigación en la detección de pesticidas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001).





MATERIALLY MÉTODOS

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 TORTUGAS

Se analizaron un total de 32 tortugas marinas con el fin de detectar los niveles de organoclorados y su posible relación con la causa de la muerte de cada ejemplar. Las tortugas fueron remitidas por el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (Cabildo de Gran Canaria) desde agosto del 2002, hasta noviembre del 2005. Con la excepción de una tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) y una tortuga verde (*Chelonia mydas*), el resto de tortugas fueron identificadas como tortugas boba (*Caretta caretta*). Las tortugas fueron recepcionadas en la Unidad de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC, donde se les realizó la necropsia y posterior estudio histopatológico.

Las tortugas procedieron de cuatro islas diferentes: Gran Canaria (n = 25), Tenerife (n = 3), Fuerteventura (n = 2), y El Hierro (n = 2). Las causas de ingreso en el Centro de Recuperación fueron las siguientes: enmallamientos en artes de pesca (n = 3), enmallamientos y amputación (n = 4), ingestión de anzuelo (n = 8), ingestión de anzuelo y traumatismo (n = 1), traumatismos (n = 6), deshidratación (n = 2), cloacitis (n = 2),

enfermedades dermatológicas (n = 2), enfermedades neurológicas (n = 1), mordedura de tiburón (n = 1), sin historia clínica (n = 2).

Los datos registrados de cada tortuga se recogen en la tabla 3.1. La clasificación por grupos de edad se hizo en base a lo descrito por BJORN DAL *et al.* (2001) y SEMINOFF *et al.* (2004) quienes establecieron una longitud recta de caparazón (LRC) inferior a 42 cm para juveniles pelágicos e igual o superior a 42 cm para juveniles.

**Tabla 3.1.** Datos de las tortugas marinas analizadas. Peso medido en kg. J. Pelágico: Juvenil pelágico; LRC: Longitud recta del caparazón (cm); LCC: Longitud curva del caparazón (cm).

TORTUGAS	ESPECIE	SEXO	EDAD	PESO	LRC	LCP
I-110/02	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	9.5	45	50
I-111/02	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	12.5	46	49
I-05/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	6.35	35	39
I-47/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	29.5	54	58
I-52/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	2.5	30	33
I-64/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	3.5	29	30
I-76/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	1.25	19.5	23
I-77/03	<i>C. caretta</i>	Macho	Juvenil	34.25	59	63
I-82/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	16	53	54
I-178/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	5.5	34	36
I-182/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	12	43	49
I-187/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	11.5	44.5	49
I-188/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	0.9	18	18.5
I-189/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	0.9	17	19.5
I-259/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	11.5	43	48.5
I-260/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	22	57	62.5
I-261/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	17.15	51	55
I-262/03	<i>C. caretta</i>	Macho	J. pelágico	8.45	38.1	42
I-264/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	19.15	50	61
I-265/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	13.4	45.5	49
I-267/03	<i>C. caretta</i>	Macho	Juvenil	20.4	51	56
I-268/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	11.2	45.2	51
I-271/03	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	6	41	41.5
I-08/04	<i>C. mydas</i>	Hembra	Juvenil	21	52	60

<b>I-36/04</b>	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	12.3	46.7	54.5
<b>I-108/04</b>	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	3.95	30	34
<b>I-109/04</b>	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	13.2	45	50
<b>I-110/04</b>	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	21	56	60
<b>I-123/04</b>	<i>C. caretta</i>	Hembra	Juvenil	11.3	46	50
<b>I-128/04</b>	<i>D. coriacea</i>	Hembra	-	231.5	-	-
<b>I-131/04</b>	<i>C. caretta</i>	Hembra	J. pelágico	4	26	31
<b>I-470/05</b>	<i>C. caretta</i>	Macho	J. pelágico	4.5	30.5	34.4

### 3.2 NECROPSIAS

La necropsia fue realizada en base a los procedimientos descritos por WOLKE & GEORGE (1981) y ORÓS & TORRENT (2001).

### 3.3 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las muestras obtenidas tras la necropsia de los animales se fijaron en formol tamponado al 10 % y se procesaron según el método habitual para microscopía óptica, incluyéndose en parafina, y realizándose cortes de 4 µm de grosor que fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina. También se aplicaron tinciones especiales para la detección de calcio (von Kossa), cobre (rodanina), plomo (rodizonato sódico), microorganismos (Gram), protozoos (PAS), hongos (PAS y Grocott), y micobacterias (Ziehl-Neelsen), en los casos que fue necesario.

### 3.4 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

El estudio microbiológico fue llevado a cabo por la Dra. Soraya Déniz, de la Unidad de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria, ULPGC. Para el aislamiento microbiológico se procedió a la cauterización de la superficie de las muestras procesadas, cortando posteriormente la muestra mediante unas tijeras flameadas, enfrentando una amplia superficie de la muestra con el correspondiente medio de cultivo sólido y arrastrándola por la placa. Las placas fueron incubadas a 25 y 30 °C y se procedió a su lectura en las siguientes 24–48 horas y posterior clonación.

Las pruebas llevadas a cabo para la identificación de las bacterias aisladas fueron las siguientes:

- oxidasa
- catalasa
- Gram
- Crecimiento en medio McConkey
- SIM (Sulfhídrico, Indol, Motilidad)
- Voges-Proskauer
- Reducción de Nitratos

Igualmente se utilizaron las galerías de identificación API 20 E, API 20 NE y API 20 STAPH (Bio Mérieux) para la identificación de los aislamientos bacterianos con perfiles bioquímicos adecuados.

### **3.5 ESTUDIO PARASITOLÓGICO**

El estudio parasitológico se centró fundamentalmente en la observación macroscópica de helmintos en aparato digestivo y de trematodos espirórcidos en corazón y grandes vasos sanguíneos. Los parásitos obtenidos se fijaron en alcohol de 70° más 5 % de glicerina. La identificación de los mismos se llevó a cabo en el Servicio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, ULPGC.

### **3.6 ESTUDIO TOXICOLÓGICO**

#### **3.6.1 Toma de muestras**

Los analitos escogidos en este trabajo se encuadran dentro del grupo de los contaminantes persistentes (POPs, Pollutant Organic Persistent) en el medio ambiente. Dichos contaminantes, a su vez, se clasifican dentro de la categoría de los organoclorados, y en este grupo nos hemos centrado en dos de ellos: la familia del DDT (dicloro difenil tricloroetano) y la de los PCB (bifenilos policlorados). La elección de este tipo de sustancias se debe fundamentalmente a que se incorporan fácilmente a la



cadena trófica debido a su escasa biodegradabilidad ambiental, pudiendo ser usados como “testigos” de la dispersión de los mismos en el medio ambiente.

Para el análisis de compuestos organoclorados se tomaron muestras de hígado y de grasa de cada ejemplar. Cada muestra se envolvió en papel de aluminio para evitar todo contacto con plástico o similares que pudieran contaminar e interferir en los resultados, y se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Las muestras de ambos tejidos se obtuvieron, siempre que resultó posible, de la porción interna de los órganos para evitar la posible contaminación superficial del tejido.

### 3.6.2 Reactivos y patrones

- Sulfato Sódico anhidro en polvo, Scharlau, pro análisis ACS ISO
- n-Hexano 96 %, Scharlau, multisolvent pro análisis HPLC, ACS ISO
- Dietil Éter, Scharlau, multisolvent pro análisis HPLC, ACS ISO
- Florisil ( Silicato de Magnesio)
- Nitrógeno comprimido gas, Carburos Metálicos , 99.9995 % - X50S
- Acetonitrilo, Scharlau, multisolvent pro análisis HPLC, ACS ISO
- Ácido Sulfúrico 95-97 %, Scharlau, multisolvent pro análisis HPLC, ACS ISO
- Diclorometano, Scharlau, multisolvent pro análisis HPLC, ACS ISO
- Isopropanol, Scharlau, multisolvent pro análisis HPLC, ACS ISO
- Metanol, Scharlau, multisolvent pro análisis HPLC, ACS ISO
- Ácido nítrico 60 %, Scharlau, pro análisis, ISO
- Patrón PCB-Mix 12, disolvente Iso-octano, IO, Dr. Ehrenstorfer.
- Patrón 2,4´DDT y metabolitos Mix 32500, disolvente Tolueno/Hexano, TH, Dr. Ehrenstorfer.
- Patrón interno 4,4´-diclorobenzofenona (DCBF), Sigma Aldrich
- Material de Referencia Certificado, CARP-2, National Research Council Canada

### 3.6.3 Material instrumental

- Aparato Extractor de Grasas, Soxhlet (BÜCHI 810)
- Aparato de vidrio para concentrar, Kuderna-Danish (Scharlau)
- Columnas de vidrio para cromatografía (Scharlau)

- Embudos cónicos de decantación (1000 ml)
- Viales de vidrio ámbar 12x32 mm. 1,8 ml., con tapón y septum de silicona/PTFE (SUPELCO)
- Cromatógrafo de Gases Varian 3600 con detector de captura de electrones (ECD)
- Columna 0.53 mm. ID Fused Silica, 30 m. de longitud x 0.50  $\mu$ m. Df. Fase: Aglomerada; poli (5 % difenil/ 95 % dimetilsiloxanos ) SUPELCO
- Fibra de polidimetilsiloxano (PDMS- 100  $\mu$ m) para SPME, SUPELCO
- Cartuchos de florisil SUPERCLEAN™ LC-18 SPE Tubes, 3ml, SUPELCO
- Cartuchos de sílice sep-pack (Waters®)
- Material de vidrio diverso

### 3.6.4 Análisis químico

Los compuestos organoclorados fueron analizados según el método descrito por TANABE *et al.* (1994).

Previo al análisis de las muestras de tortugas, el método fue satisfactoriamente comprobado, como se puede ver en la tabla 3.2, mediante el tejido de referencia certificado de carpa, CARP-2 (National Research Council Canada).

Los resultados basados en cuatro de los congéneres analizados se encontraron dentro del rango que el patrón define para aceptar el método (Tabla 3.2), certificando la validez del método completo de separación y análisis.

**Tabla 3.2** Análisis de CARP-2 mediante método de Tanabe *et al.* (1994) ( $\mu$ g/kg. de peso húmedo).

CONGÉNERES DE PCB	RESULTADOS	CARP-2
52	119.7 $\pm$ 13.9	138 $\pm$ 43
153	116 $\pm$ 16.6	105 $\pm$ 22
180	59.2 $\pm$ 10.7	53.3 $\pm$ 13
28	27.3 $\pm$ 1.5	34 $\pm$ 7.2

Se seleccionaron entre 4 y 7 gramos de cada muestra de tejido y se homogeneizaron junto a 30 gramos de sulfato sódico en un dispositivo triturador en el

que se tuvo especial cuidado en que la muestra se expusiera a la menor cantidad posible de superficie plástica.

Tras quedar la muestra triturada, homogeneizada, y seca gracias al sulfato sódico (Fig. 3.1), se procedió a continuación a la extracción del contenido graso de los tejidos. La extracción se efectuó en un equipo Soxhlet (con capacidad para procesar seis muestras a la vez) empleando 300 ml de diétil éter y hexano como extractante en una proporción volumétrica de 3:1, respectivamente (Fig. 3.2).

**Fig. 3.1** Homogeneización y secado de la muestra



**Fig. 3.2** Extracción de grasas con Soxhlet



El tiempo de extracción varió entre 4 y 6 horas según las condiciones del aparato en el momento de su uso. La alta variabilidad en el tiempo de extracción, según las observaciones realizadas, dependió casi exclusivamente de la rapidez con la que la placa alcanzó la temperatura de consigna. Esta variación hizo que el recirculado del volumen total de extractante se produjese en distintos tiempos para los diferentes procesados de muestras.

Una vez conseguido el recirculado de todo el extractante, el extracto se concentró hasta 10 ml mediante Kuderna-Danish, usando un baño de arena como fuente de calor (Fig. 3.3). Del extracto concentrado, se tomó una alícuota de 2 ml y se la hizo pasar a través de una columna de vidrio empaquetada con 20 g de Florisil durante 2 horas en contacto con nitrógeno (Fig. 3.4).

**Fig. 3.3** Concentración en Kuderna-Danish **Fig 3.4** Columnas de Florisil con N2



La muestra retenida en la columna se eluyó con una mezcla de 150 ml de acetonitrilo 80 % y agua mili-Q, comenzando en esta etapa la purificación de la muestra conservando su contenido en organoclorados (Fig. 3.5).

El lavado continuó en un embudo de decantación en el que previamente se habían preparado 100 ml de hexano y 600 ml de agua bidestilada. Se agitó durante 15 minutos y se dejó reposar hasta la separación definitiva de ambas capas (Fig. 3.6). Se desechó la capa inferior y se realizaron dos nuevos lavados con agua. Se volvió a concentrar, esta vez hasta 5 ml, y se lavó nuevamente con aproximadamente 5 ml de ácido sulfúrico, para a continuación realizar dos lavados sucesivos con agua.

**Fig. 3.5** Elusión con acetonitrilo



**Fig.3.6** Separación de capas



Una vez purificada la muestra, se tomó una alícuota de 2-3 ml y se la hizo pasar por otra columna con 12 gramos de Florisil activado (Florisil en estufa a 120-130°C durante 12 horas) (Fig. 3.7). La muestra retenida en la columna se sometió a una elución en dos etapas: a) Eluyente 100 ml de hexano, recuperando una primera fracción conteniendo, mayoritariamente, los PCBs y el *p,p'*-DDE y b) Eluyente 100 ml de una mezcla de hexano y diclorometano, de razón volumétrica 80:20, respectivamente, a partir de la cual, se extraen, preferentemente, el DDT y el *p,p'*-DDD (Fig 3.8).

**Fig. 3.7** Activación de Florisil



**Fig. 3.8** Elución con hexano y acetonitrilo



A continuación se concentró cada fracción hasta 1 ml, estando preparada de este modo para la inyección en el cromatógrafo de gases (Fig. 3.9 y 3.10). Hasta el momento de la inyección (que no debe dilatarse en el tiempo debido a la conocida volatilidad de los analitos y su permeabilidad a través del septum de los viales), las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4 °C en viales de vidrio debidamente etiquetados y herméticamente cerrados para evitar pérdidas por evaporación.

**Fig.3.9** Elución y Concentración



**Fig. 3.10** Cromatógrafo de gases



De cada fracción se inyectaron de forma manual 5 microlitros en el cromatógrafo de gases. La columna fue programada a partir de una temperatura inicial de 60 °C, manteniéndose durante un minuto y elevándose a 160 °C aumentando 20 °C por minuto, manteniéndose 10 minutos y elevando la temperatura a razón de 2 °C/minuto hasta 260 °C durante 20 minutos. El tiempo total del programa fue de 86 minutos. La temperatura del inyector y del detector se mantuvieron a 260 y 280 °C respectivamente. Como gas portador se utilizó nitrógeno con un flujo de 63.3 ml/minuto. Como estándares se usaron los patrones de PCBs y DDTs de composición y cantidad establecidas. La cuantificación de los pesticidas se realizó a partir de las áreas de los picos individuales comparándolas con las áreas calculadas de los estándares mediante la realización de curvas de calibrado (Fig 3.11 y 3.12).

**Fig. 3.11** Curvas de calibrado para congéneres de PCBs: 180,153,209,138,28,31,101 y 52

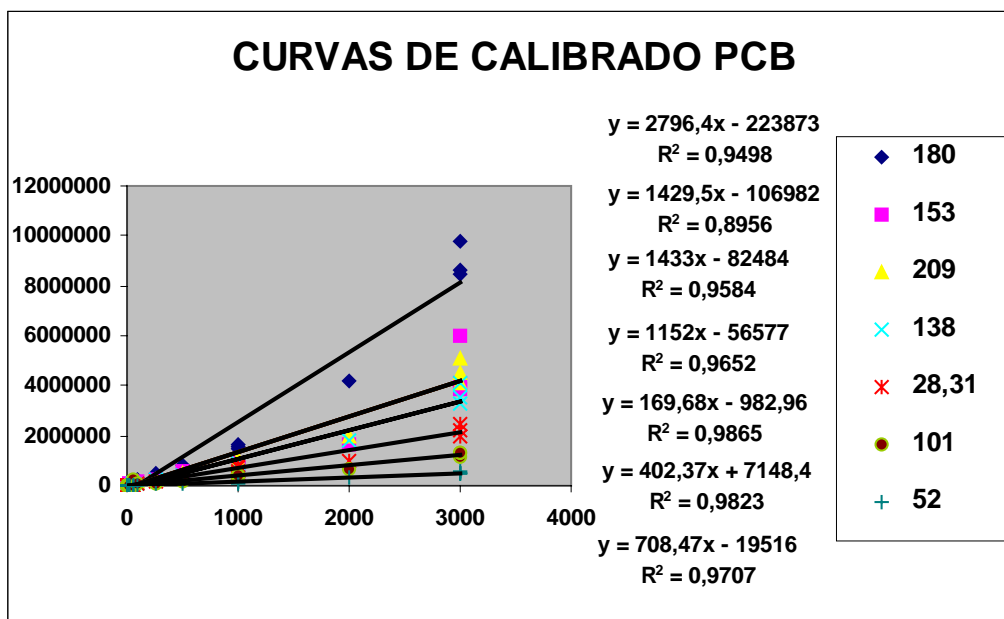
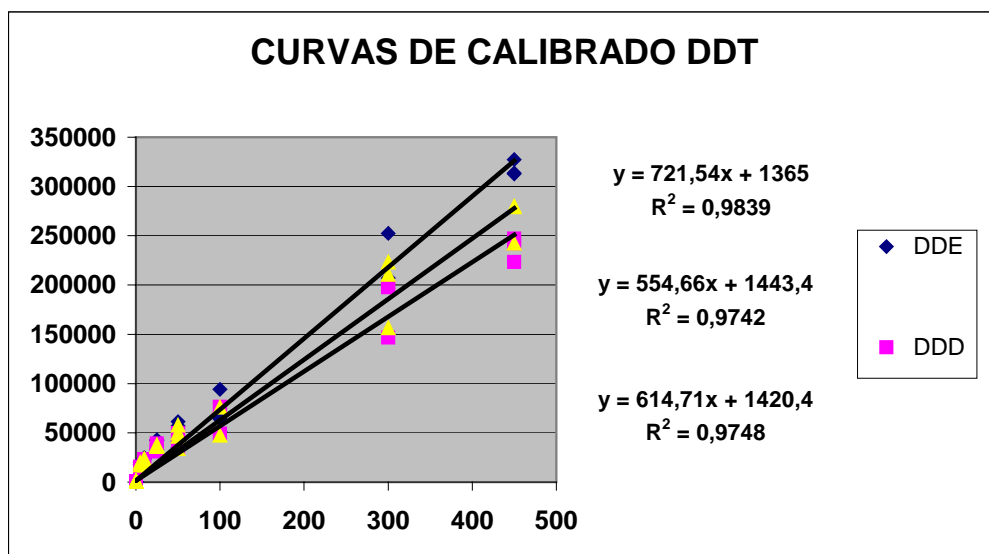


Fig. 3.12 Curvas de calibrado para 2,4'-DDT, 2,4'-DDD y 2,4'-DDE



De cada muestra de tejido a analizar se hicieron duplicados para el proceso de extracción de grasa y purificación, y dos inyecciones en el cromatógrafo de gases por cada duplicado. Con ello se intentó disminuir el rango de error posible por el largo procesamiento al que se sometieron las muestras y a la alta sensibilidad que tiene el tipo de detector utilizado. Así, para cada tejido se obtuvieron cuatro valores cuya media fue calculada. Durante el análisis de las muestras se procesaron simultáneamente una serie de blancos para verificar la ausencia de interferencias o contaminación de la columna.

En todo momento el material se lavó adecuadamente con detergente y ácido nítrico, asegurando así la eliminación total de detergente y residuos que pudieran afectar el contenido de las muestras. Todo el trabajo del procesamiento muestral se llevó a cabo bajo una campana extractora y con el uso de guantes y mascarilla cuando resultó necesario con el fin de evitar la inhalación de gases tóxicos y el contacto directo con los contaminantes y reactivos.

### 3.6.5 ESTUDIO ESTADÍSTICO

Las concentraciones de organoclorados resultantes se analizaron mediante Microsoft Excel y SPSS 13.0 para Windows.

### 3.6.6 DETECCIÓN DE ORGANOCORADOS EN MUESTRAS DE SANGRE

Del total de ejemplares de tortugas marinas que llegaron durante los últimos cinco años al Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira, se pudieron rescatar once muestras de plasma para analizar su contenido en organoclorados. Tres de esas muestras sanguíneas pertenecían a tortugas cuyas muestras de tejido hepático y adiposo también habían sido analizadas en el presente estudio. El análisis de las muestras se realizó en la Unidad de Toxicología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

A partir del plasma de tortuga extraído se tomó 1 ml y se añadieron 2 ml de metanol para precipitar las proteínas. Tras agitación y centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm se añadieron 5 ml de éter etílico-hexano 1:1 al sobrenadante y se agitó con fuerza. Esta operación de extracción se repitió tres veces. A continuación, se separaron las fases orgánicas concentrándolas a 2 ó 3 ml en corriente de nitrógeno. Al residuo obtenido se le añadió 0,5 ml de ácido sulfúrico, procediendo a la agitación y centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm separando la fase orgánica. Finalmente se desecó la fase orgánica mediante flujo de nitrógeno. Para la fase acuosa se repitió dos veces más con 1 ml de hexano.

Para purificar las muestras de plasma se utilizó cromatografía en columna mediante cartuchos sep-pack (Waters®) rellenos de sílice. El extracto orgánico obtenido se recuperó con 5 ml de hexano, se pasó por el cartucho y se eluyó primero con 10 ml de hexano y a continuación, con 10 ml de hexano:metanol:isopropanol (45:40:15). Una vez eluido todo el disolvente se concentró hasta sequedad en presencia de nitrógeno. Con ello se obtuvo un residuo conteniendo los organoclorados que anteriormente se encontraban en el plasma.

Para determinar los analitos de las muestras se utilizó cromatografía de gases con detector de captura de electrones a 300 °C e inyector a 250 °C. El programa empleado fue: Temperatura inicial 130 °C durante 1 minuto; 20 °C/min hasta alcanzar 150 °C; 10 °C/min hasta 200 °C; 20 °C/min hasta 260 °C y mantenimiento de esta temperatura durante 20 minutos. El gas portador y auxiliar fue nitrógeno con un flujo de 30 ml/min y 40 ml/min respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µl. Para la cuantificación del análisis cromatográfico se utilizó el patrón interno DCBF.

Las determinaciones cromatográficas realizadas fueron confirmadas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. Las condiciones de trabajo fueron: Temperatura del horno: 50 °C (2 min), 30 °C/min hasta 185 °C (1 min), 2 °C/min hasta 250 °C y a 30 °C/min hasta 300 °C (5 min); Temperatura del inyector: 250 °C; Flujo del

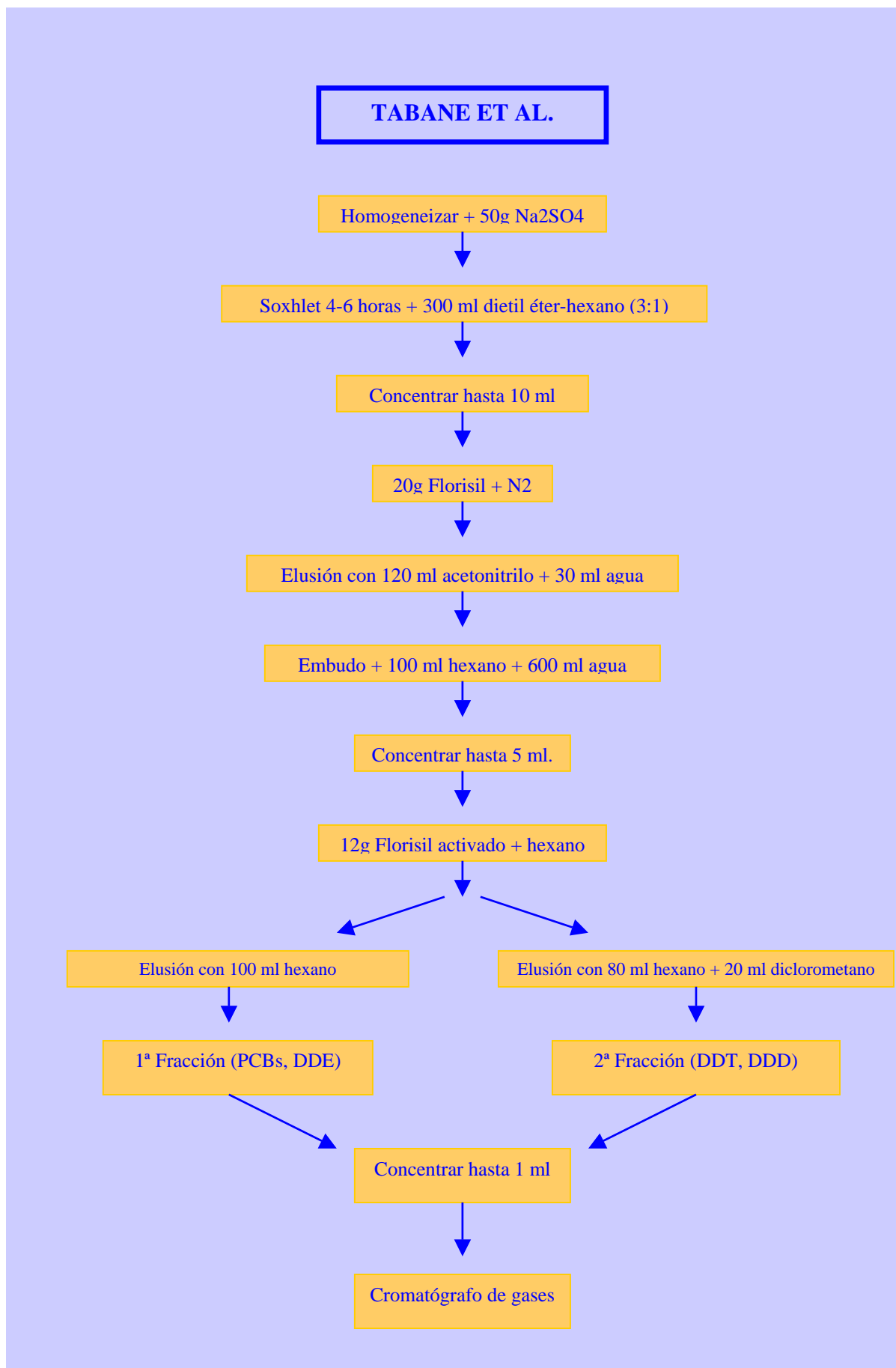


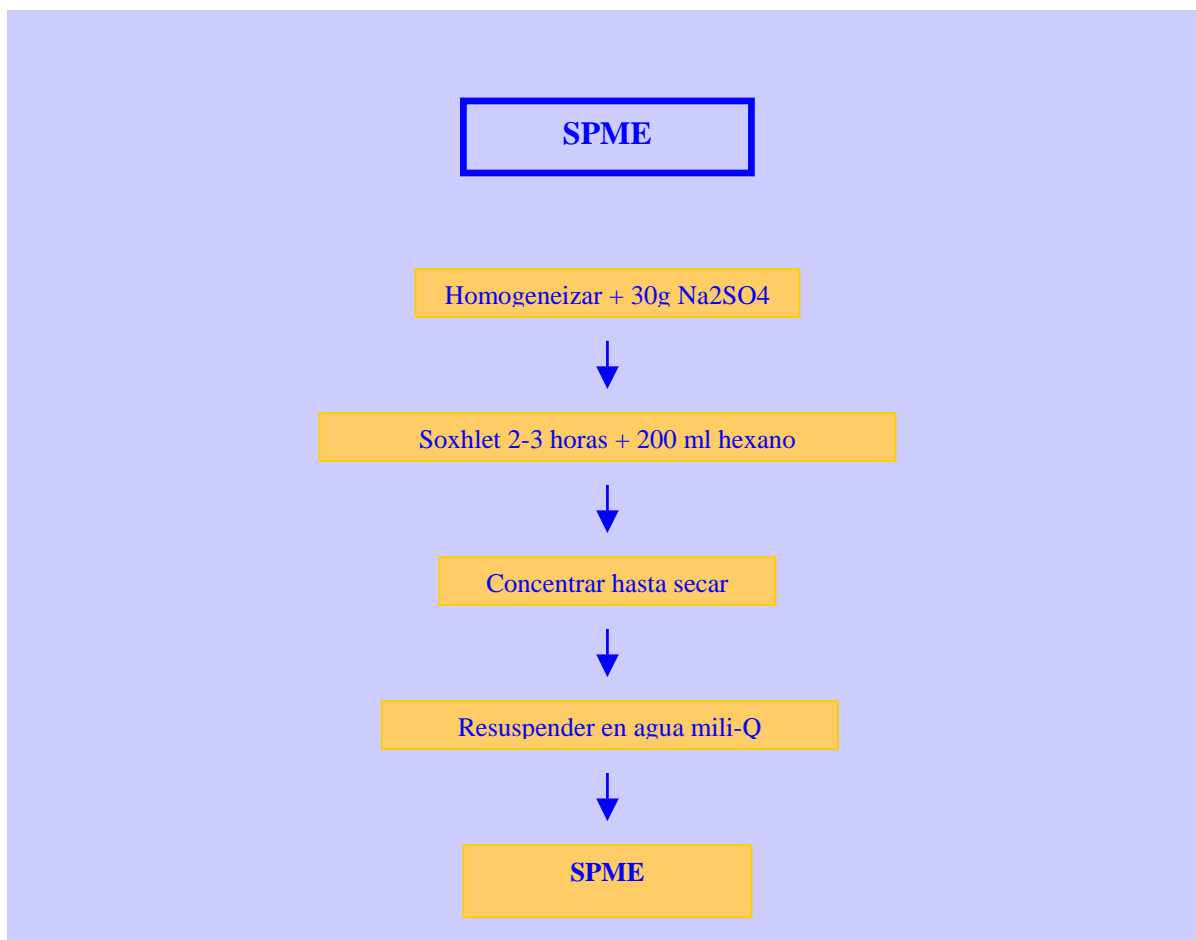
inyector: 1 ml/min; Temperatura de la trampa de iones del espectrómetro de masas: 200 °C; Temperatura del colector: 50 °C; Temperatura de la línea de transferencia 280 °C; Voltaje de modulación axial: 3.8 volts. El gas portador utilizado fue helio y el volumen de inyección de 2 µl.

### **3.6.7 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)**

El método elegido para la determinación de compuestos organoclorados en las tortugas marinas analizadas en este estudio ha sido el descrito por TANABE *et al.*, en 1994, comprobado satisfactoriamente a partir del material certificado de referencia CARP-2 (National Research Council Canada). Si bien el método supone unos niveles de recuperación altamente destacables, es necesario mencionar, que al igual que la mayoría de los análisis más eficaces en el aislamiento de sustancias organocloradas, precisa de un complejo y costoso sistema de purificación tras la extracción con disolventes orgánicos, que evite el daño de la columna y la contaminación de los detectores empleados en el cromatógrafo de gases. Ello conlleva un proceso para el que se necesita mucho tiempo de elaboración con una mayor posibilidad de pérdida de analitos, y una gran cantidad de costosos disolventes orgánicos que atentan contra nuestra salud y el medio ambiente. Estas son las razones que nos han llevado a desarrollar un estudio preliminar sobre la SPME como método alternativo en la detección de organoclorados a partir de muestras de tejido animal.

En el esquema que se muestra a continuación, se pueden ver las diferentes etapas para la detección de organoclorados en tejido animal según cada método.





Para el estudio preliminar de la SPME como alternativa a la metodología convencional en la detección de organoclorados en tejido animal, se llevaron a cabo diferentes ensayos basados en la bibliografía consultada con el fin de optimizar las distintas variables que inciden en el resultado.

### **Ensayo número 1**

A partir de 1-3 gramos de tejido de referencia CARP-2 (National Research Council Canada) y 5-6 gramos de sulfato sódico se procedió a homogeneizar la muestra y eliminar el contenido en agua. El extracto resultante se llevó al vortex con 5 ml de hexano durante 3 minutos. Una vez se mezclaron adecuadamente, se pasó por una bureta y se descartó la fase inferior. Este paso se repitió dos veces más para extraer el mayor contenido posible de analitos. A continuación, se concentró la muestra hasta secar y se recuperó con 3 ml de hexano.

De las muestras resultantes de este proceso, unas se trataron directamente con SPME y otras se pasaron por un cartucho SPE de florisil para comparar los resultados de ambas y el grado de purificación de las muestras. La elusión de estas últimas se llevó a cabo con 3 ml. de hexano.

Las condiciones durante la SPME fueron: absorción durante 45 minutos con agitación magnética y desorción a 250°C durante 5 minutos. El programa seleccionado para la columna del cromatógrafo de gases fue el mismo que en el caso del método de detección según TANABE *et al.* (1994) Tras la desorción de los analitos se comprobó la no contaminación de la fibra con restos de muestras anteriores sometiéndola a una nueva desorción y verificando en el cromatograma la ausencia de analitos.

### **Ensayo número 2**

Este ensayo se realizó como consecuencia del anterior con el que no se detectó nivel alguno de organoclorados en el tejido de referencia, hipotetizando que el hexano como solución final en la que se encuentran los analitos pudiera impedir (debido a su alta afinidad por compuestos orgánicos como los organoclorados) que éstos pasaran a la fibra y quedaran así retenidos en la solución. Se ensayó entonces con hexano y una cantidad conocida de patrón de PCBs que permitiera comprobar el grado de adsorción de la fibra, comparándose con los resultados de utilizar agua mili-Q y la misma cantidad de patrón de organoclorados. Se hicieron diferentes ensayos para comprobar la optimización de las variables: tiempo de absorción y presencia o ausencia de agitación y sales. El tiempo de absorción se varió en 30, 45 y 90 minutos.

### **Ensayo número 3**

A partir de los resultados obtenidos se llevó a cabo el análisis con tejido de referencia CARP-2 y agua mili-Q en lugar de hexano como disolvente de recuperación final de la muestra tras la concentración hasta el secado, como se describe en el ensayo 1, sin el paso adicional de la muestra a través del cartucho de florisil. Las condiciones de absorción y desorción fueron las mismas, pues resultaron las más favorables, según el ensayo anterior.

### **Ensayo número 4**

A pesar de la mejora de los resultados, el hecho que las concentraciones detectadas aún no fueran coincidentes con el rango del patrón de referencia CARP-2,

planteó si podía tratarse de un aspecto relacionado con el volumen de la muestra. Se llevó a cabo un ensayo en el que se compararon las concentraciones obtenidas de analizar tejido adiposo y hepático de tortugas tratadas según el método descrito por TANABE *et al.* (1994) y cuya grasa se extrajo mediante soxhlet con 200 ml. de hexano frente a muestras cuya extracción se realizó según el ensayo 1. A cada muestra de tejido se le realizó un duplicado al cual se le inyectó una cantidad conocida de PCBs para comparar los niveles de recuperación.







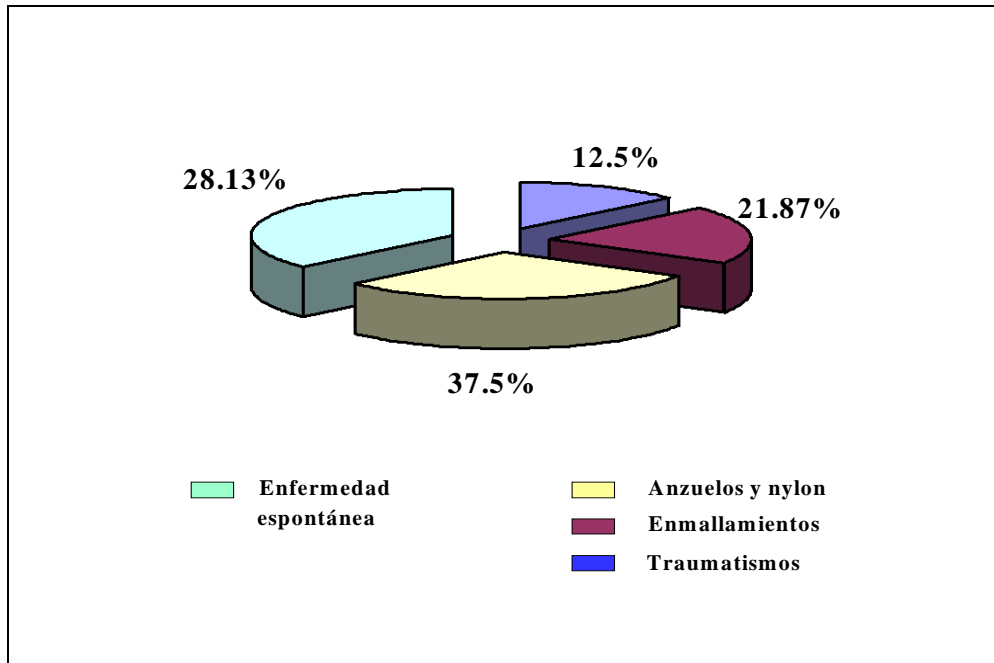
RESULTADOS

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO**

Tras la necropsia y el correspondiente estudio histológico de cada tortuga se concluyó que un 71.87 % (23/32) de las tortugas resultaron muertas por causas directas relacionadas con la actividad humana: ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca (37.5 %, 12/32), enmallamientos (21.87 %, 7/32) y traumatismos contra embarcaciones (12.5 %, 4/32) (Figura 4.1). El resto de los ejemplares (28.13 %, 9/32) murieron debido a diferentes patologías, entre las que destacan septicemias bacterianas, enfisema pulmonar, queratoconjuntivitis purulenta, adenitis purulentas de las glándulas excretoras de la sal y lesiones en cloaca e intestino entre otras. Los informes detallados de cada tortuga se muestran a continuación.





**Figura 4.1** Causas de mortalidad en tortugas marinas en el período de estudio (Agosto 2002-Noviembre 2005)

## 4.2 INFORMES DE NECROPSIA

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-110/02</b>	Longitud curva del caparazón	<b>50 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>40 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>47 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>9.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 23 de Agosto de 2002 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST TF2674), con una historia clínica de ingestión de anzuelo.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa caquexia y hundimiento del plastrón. Se observó la presencia de abundante líquido en cavidad celómica, así como fibrina en serosas digestivas y en superficie pulmonar. Se observó la presencia de material purulento en serosa del esófago junto a la bifurcación traqueal, un trayecto fistuloso hacia tráquea y otro hacia la columna vertebral con material purulento en la articulación intervertebral a nivel cervical. El esófago se mostró totalmente obstruido debido al material purulento y la inflamación. No se observó contenido en el tracto gastrointestinal. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa hepatitis necrótica multifocal</li> <li>- Severa esofagitis purulenta</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de esófago demostró el aislamiento de <i>E. coli</i> y <i>Proteus</i> sp., mientras que a partir de hígado y bazo se aisló <i>Proteus</i> sp.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa esofagitis purulenta</li> <li>- Severa hepatitis necrótica multifocal</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las lesiones esofágicas obedecen a los efectos traumáticos de la ingestión de un anzuelo, originado lesiones incluso a nivel vertebral. Las lesiones hepáticas obedecen al estado septicémico del animal.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-111/02</b>	Longitud curva del caparazón	<b>49 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>40 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>49 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>12.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 23 de Agosto de 2002 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 328/02), con una historia clínica de gestión de anzuelo.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró abundante cantidad de líquido hemorrágico en la cavidad celómica. Se observó la presencia de un anzuelo en la porción caudal del estómago, perforándolo e interesando al lóbulo hepático izquierdo. En el intestino se observó un síndrome de cuerpo extraño lineal en intestino anterior, y una severa intususcepción intestinal en intestino medio y posterior (segmento intususcepcionado de 60 cms). Se observó una fístula en esófago proximal con abundante material purulento. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa perihepatitis granulomatosa multifocal, con presencia de células gigantes multinucleadas</li> <li>- Severa esofagitis purulenta</li> <li>- Severa gastritis purulenta ulcerativa</li> <li>- Severa necrosis intestinal (segmento intususcepcionado)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo resultó negativo.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa perihepatitis granulomatosa multifocal</li> <li>- Severa gastritis purulenta ulcerativa traumática (anzuelo)</li> <li>- Severa necrosis intestinal (segmento intususcepcionado)</li> <li>- Severa esofagitis purulenta traumática</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las lesiones digestivas observadas en esta tortuga son típicas de un caso de ingestión de anzuelo, si bien es menos frecuente la detección del anzuelo en estómago. La severidad de las lesiones intestinales observadas justifica la muerte del animal.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-05/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>39 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>31.5 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>37 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	Peso	<b>6.25 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 17 de Enero de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 21/03), con una historia clínica de enmallamiento, necrosis de aleta delantera derecha, fractura de húmero y amputación quirúrgica.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa caquexia, con ausencia de depósitos grasos en cavidad celómica, atrofia serosa en cara interna del plastrón, y falta de osificación de las estructuras constitutivas del plastrón. Todos los órganos se mostraron extremadamente pálidos. Se observaron larvas de nematodos atravesando la cápsula hepática en moderado número. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderada perihepatitis granulomatosa de origen parasitario</li> <li>- Severa depleción linfocitaria en bazo, con presencia de numerosos megacariocitos</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e hígado demostró el aislamiento de <i>E. coli</i>.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderada perihepatitis granulomatosa de origen parasitario</li> <li>- Severa anemia</li> <li>- Severa depleción linfocitaria en bazo</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>La muerte de este ejemplar se relaciona con la severa anemia (puesta de manifiesto además de por la historia clínica, por la presencia de megacariocitos en bazo) y deshidratación observada, como consecuencia de las lesiones en la extremidad objeto del enmallamiento. La severa depleción linfocitaria observada en bazo es indicativa de un proceso crónico.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
CASO Nº	I-47/03	Longitud curva del caparazón	58 cm
ESPECIE	Tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> )	Ancho recto del caparazón	47 cm
SEXO	hembra	Ancho curvo del caparazón	57.2 cm
EDAD	juvenil	Peso	29.5 Kg
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 6 de Febrero de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 14/03), con una historia clínica de presencia de anzuelo en esófago.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró numerosas algas y epibiontes en caparazón. En esófago cervical se observó la presencia de un anzuelo perforando la mucosa esofágica e interesando a la musculatura cervical mediante un trayecto fistuloso con abundante material purulento. En el interior de la cavidad celómica se observó abundante fibrina sobre la membrana celómica y sobre la serosa intestinal. Estómago e intestino anterior presentaron un síndrome de cuerpo extraño lineal. El intestino posterior presentó una severa intususcepción intestinal de 20 cm. El segmento intestinal intususcepcionado se mostró necrótico. No se observaron parásitos. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa esofagitis fibrinopurulenta</li> <li>- Severa poliserositis fibrinosa</li> <li>- Severa enteritis necrótico purulenta (intestino posterior)</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo demostró el aislamiento de <i>Proteus vulgaris</i> .			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa esofagitis fibrinopurulenta de origen traumático (anzuelo)</li> <li>- Severa poliserositis fibrinosa</li> <li>- Severa enteritis necrótico purulenta (intestino posterior)</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las lesiones observadas en este ejemplar son las típicas de un caso severo de ingestión de anzuelo y monofilamento de pesca (perforación de esófago, síndrome de cuerpo extraño lineal e intususcepción intestinal) y septicemia posterior.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>30 cm</b>
<b>CASO N°</b>	<b>I-52/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>33 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>27 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>31 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>Juvenil pelágica</b>	Peso	<b>2.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 17 de Febrero de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 61/03), con una historia clínica de enmallamiento en cuello y necrosis en rostro afectando a párpados y ojos.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal se mostró extremadamente caquéctico, con ausencia de depósitos grasos en la cavidad celómica. En el cuello presentó una herida lineal profunda interesando a musculatura cervical. La cabeza en su parte rostral presentó lesiones antiguas parcialmente resueltas. La mucosa gástrica presentó un tono rojizo y abundante moco. El intestino posterior presentó una severa dilatación con abundante contenido líquido marrón. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa hepatitis granulomatosa multifocal con presencia de células gigantes multinucleadas.</li> <li>- Severa gastritis catarral, con presencia de larvas de nematodos en submucosa gástrica y reacción granulomatosa con células gigantes multinucleadas.</li> <li>- Moderada enteritis necrótica</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e intestino demostró el aislamiento de <i>Vibrio alginolyticus</i>.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa hepatitis granulomatosa multifocal.</li> <li>- Severa gastritis catarral de etiología parasitaria</li> <li>- Moderada enteritis necrótica</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las lesiones relacionadas con la muerte de este ejemplar son las observadas a nivel intestinal y hepático, siendo de origen infeccioso.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-64/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>30 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>30 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>29.5 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	Peso	<b>3.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 4 de Abril de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 122/03), con una historia clínica de deformación del caparazón (ensillamiento), pérdida de extremidad posterior derecha, amputación de extremidad delantera derecha por enmallamiento, y caquexia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa caquexia con ausencia de depósitos grasos en la cavidad celómica. La cavidad celómica mostró abundante líquido serosanguinolento de aspecto claro. Los órganos se mostraron extremadamente pálidos. El canal vertebral mostró un estrechamiento significativo en la zona del ensillamiento. Se observó la presencia de moderada cantidad de fibrina adherida a la membrana celómica. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderada celomitis fibrinosa</li> <li>- Moderada hemorragia meníngea en la médula espinal (área del ensillamiento)</li> <li>- Moderada presencia de larvas de nematodos en la submucosa gástrica con reacción granulomatosa</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e intestino resultó negativo.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderada celomitis fibrinosa</li> <li>- Moderada parasitosis gástrica</li> <li>- Moderada hemorragia meníngea en la médula espinal (ensillamiento)</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>La ausencia de dos extremidades junto a las lesiones en la médula espinal justifican la eutanasia del ejemplar dada su inviabilidad.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-76/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>23 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>17.5 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>22 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	Peso	<b>1.25 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 15 de Abril de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 135/03), con una historia clínica de anemia, necrosis de la extremidad delantera derecha por enmallamiento, y muerte durante la anestesia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa caquexia con ausencia de depósitos grasos en la cavidad celómica. El hígado y bazo mostraron depósitos de fibrina en la cápsula hepática. El tracto gastrointestinal se mostró sin contenido. Los órganos se mostraron extremadamente pálidos. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa con presencia de colonias bacterianas basófilas</li> <li>- Severa periesplenitis fibrinosa con presencia de colonias bacterianas basófilas</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e hígado demostró el aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa</li> <li>- Severa periesplenitis fibrinosa</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>La muerte de este ejemplar se relaciona con las lesiones hepáticas y esplénicas de origen infeccioso (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) como consecuencia de la entrada de microorganismos a través de las lesiones necróticas en la extremidad enmallada, todo ello agravado por el estado anémico del ejemplar.</p>			



<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-77/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>63 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>53 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>Macho</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>62 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>34.25 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 23 de Abril de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil macho de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 151/03), con una historia clínica de antigua esofagotomía cervical para la extracción de anzuelo.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa edematización de la región cloacal. La cavidad celómica mostró abundante líquido turbio. El hígado presentó una moderada hepatomegalia y áreas de degeneración hepática con consistencia friable. La mucosa gástrica se observó congestiva y hemorrágica. Todo el tracto intestinal se mostró impactado con contenido consistente en restos de erizos. La pared intestinal se mostró edematizada y la mucosa necrótica. Un segmento intestinal necrótico presentó una disposición en acordeón. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa gastritis hemorrágica</li> <li>- Severa enteritis necrótica</li> <li>- Moderada degeneración vacuolar hepática</li> <li>- Moderada reacción inflamatoria periportal hepática</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
-			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa gastritis hemorrágica</li> <li>- Severa enteritis necrótica por impactación (erizos)</li> <li>- Moderada degeneración vacuolar hepática</li> <li>- Moderada reacción inflamatoria periportal hepática</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las lesiones observadas en este ejemplar corresponden a una caso de severa impactación intestinal por consumo de erizos. Hemos tenido casos semejantes en años anteriores, siempre en ejemplares subadultos.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>53 cm</b>
<b>CASO Nº</b>	<b>I-82/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>54 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>44 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>51 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>16 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 30 de Abril de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 181/03), con una historia clínica de caquexia, y anzuelo en intestino.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró un monofilamanto de nylon saliendo por boca y cloaca (Fig. 4.2). En el esófago se observó una fístula con material purulento llegando a interesar a la musculatura cervical. La cavidad celómica mostró una gran cantidad de depósitos de fibrina sobre las serosas digestivas y sobre la membrana celómica. Se observó una severa perihepatitis fibrinosa, con necrosis hepática de la porción apical del lóbulo hepático derecho. El tracto gastrointestinal presentó un síndrome de cuerpo extraño lineal, con necrosis de la mucosa. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa poliserositis fibrinosa gastrointestinal</li> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> <li>- Severa enteritis necrótica</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e intestino demostró el aislamiento de bacterias de la Familia Streptococaceae. El <b>estudio parasitológico</b> del contenido gastrointestinal resultó negativo.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa poliserositis fibrinosa gastrointestinal</li> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> <li>- Severa enteritis necrótica</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las lesiones digestivas observadas en este ejemplar son las típicamente detectadas en casos extremos de ingestión de monofilamento de nylon y anzuelo en intestino, y su gravedad justifica la eutanasia del animal.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-178/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>36 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>30 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>35 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	Peso	<b>5.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 2 de Junio de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 168/03), con una historia clínica de cloacitis y posible septicemia.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>neropsia</b> el animal mostró una gran cantidad de líquido de aspecto turbio. Se observó una severa obstrucción en cloaca formada por una masa purulenta de 10x3 cm. La mucosa cloacal presentó una membrana de fibrina adherida a su superficie. La vejiga urinaria presentó contenido fecal por reflujo. La porción media de intestino mostró una severa enteritis necrótico-purulenta (Fig. 4.3 y 4.4). Todo el tracto intestinal presentó abundante contenido líquido de color marrón rojizo. Se observaron depósitos de fibrina en los bordes hepáticos. Ambos riñones mostraron focos blanquecinos de 1-2 mm de diámetro en su parénquima. Las vías aéreas se encontraron llenas de espuma. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa hepatitis nerótica multifocal</li> <li>- Severa nefritis granulomatosa multifocal asociada a la presencia de colonias bacterianas basófilas</li> <li>- Severa cloacitis necrótico purulenta</li> <li>- Severa enteritis necrótico purulenta</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo, cloaca e intestino demostró el aislamiento de <i>Citrobacter freundii</i> y de <i>E. coli</i> .			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa hepatitis nerótica multifocal</li> <li>- Severa nefritis granulomatosa multifocal de etiología bacteriana</li> <li>- Severa cloacitis necrótico purulenta</li> <li>- Severa enteritis necrótico purulenta</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
La muerte del animal se relaciona con la gravedad de las lesiones observadas en cloaca e intestino, y posterior septicemia.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>43 cm</b>
<b>CASO N°</b>	<b>I-182/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>49 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>44 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>47 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>12 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 11 de Junio de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 210/03), con una historia clínica de queratitis.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa queratoconjuntivitis purulenta bilateral (Fig. 4.5). Se observó la presencia de numerosos granulomas de distribución multifocal en la cápsula hepática. Se observaron restos de crudo en la luz esofágica, gástrica y en intestino anterior. El intestino anterior se encontró plegado alrededor del eje longitudinal, pero no se encontró ningún cuerpo lineal en su luz. El riñón izquierdo mostró pequeños focos blanquecinos en su parénquima. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa nefritis purulenta multifocal asociada a la presencia de colonias bacterianas basófilas</li> <li>- Severa perihepatitis purulenta multifocal asociada a la presencia de colonias bacterianas basófilas</li> <li>- Severa queratoconjuntivitis purulenta</li> <li>- Edema pleural</li> <li>- Severa enteritis necrótica purulenta</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras del exudado ocular demostró el aislamiento de <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella ornithinolytica</i> . A partir de párpado y globo ocular se aisló <i>Vibrio alginolyticus</i> . Los intentos de aislamiento a partir de hígado resultaron negativos			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa nefritis purulenta multifocal de etiología bacteriana</li> <li>- Severa perihepatitis purulenta multifocal</li> <li>- Severa queratoconjuntivitis purulenta de etiología bacteriana</li> <li>- Severa enteritis necrótica purulenta</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
La muerte del animal se relaciona con las lesiones de carácter purulento observadas a nivel renal e intestinal. Se descarta una posible etiología vírica para las lesiones oculares observadas en este ejemplar.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-187/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>49 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>39 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>46 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>11.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 12 de Junio de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 273/03), con una historia clínica de anzuelo en intestino.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró un foco de necrosis de 2x3 cm en el lóbulo hepático derecho. Se observó una severa intususcepción de 20 cm de longitud de estómago en intestino (Fig. 4.6), con un anzuelo con nylon perforando la pared gástrica (Fig. 4.7). En el intestino anterior se observó un síndrome de cuerpo extraño lineal y necrosis de la mucosa intestinal. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa enteritis necrótica</li> <li>- Severa gastritis necrótico purulenta</li> <li>- Severa hepatitis necrótica focal asociada a la presencia de colonias bacterianas basófilas</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo, hígado e intestino demostró el aislamiento de <i>Vibrio alginolyticus</i> y <i>E. coli</i> . El <b>estudio parasitológico</b> del contenido gastrointestinal resultó negativo.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa enteritis necrótica</li> <li>- Severa gastritis necrótico purulenta</li> <li>- Severa hepatitis necrótica focal asociada a la presencia de colonias bacterianas basófilas</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
La muerte del animal se produjo como consecuencia de las severas lesiones digestivas causadas por la ingestión del anzuelo y del monofilamento de pesca, y posterior septicemia.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>18 cm</b>
<b>CASO N°</b>	<b>I-188/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>18.5 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>15 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>16 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	Peso	<b>0.9 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 16 de Junio de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 208/03), con una historia clínica de erosiones en cara ventral de extremidades delanteras, síntomas neurológicos y alteraciones en la flotación.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró áreas de severa dermatitis en las extremidades delanteras. Se observó como lesión más relevante un enfisema pulmonar bilateral. Los órganos parenquimatosos se observaron moderadamente pálidos. El bazo mostró un tamaño considerablemente inferior al normal para la talla de la tortuga. Todo el tracto gastrointestinal se mostró sin contenido. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severo enfisema pulmonar</li> <li>- Severa dermatitis necrótico purulenta</li> <li>- Severa depleción linfocitaria esplénica</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo y pulmón demostró el aislamiento de <i>E. coli</i> . El <b>estudio parasitológico</b> del contenido gastrointestinal resultó negativo.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severo enfisema pulmonar</li> <li>- Severa dermatitis necrótico purulenta</li> <li>- Severa depleción linfocitaria esplénica</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
La depleción linfocitaria esplénica obedece a un proceso crónico posiblemente iniciado como consecuencia de las lesiones en las extremidades anteriores. Las alteraciones observadas en la flotación se explican por el severo enfisema pulmonar bilateral observado. No se observaron lesiones neurológicas que justifiquen la sintomatología nerviosa referida.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-189/03</b>	Longitud curva del caparazón	19.5 cm
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	14 cm
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	18.5 cm
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	Peso	0.9 Kg
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 19 de Junio de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 299/03), con una historia clínica de perforación doble en caparazón, cloacitis y anemia.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>neropsia</b> el animal mostró dos severas perforaciones de caparazón con afectación de la médula espinal. Todos los órganos se mostraron muy pálidos. El hígado se mostró friable y con áreas de necrosis. El tracto intestinal presentó un aspecto necrótico. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa hepatitis nerótica multifocal</li> <li>- Severa tubulonefrosis renal</li> <li>- Necrosis de la médula espinal. Mielitis purulenta.</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de hígado y bazo resultó negativo.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa hepatitis nerótica multifocal</li> <li>- Severa tubulonefrosis renal</li> <li>- Necrosis de la médula espinal. Mielitis purulenta.</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
La muerte del animal se relaciona con la gravedad de las lesiones observadas en el caparazón con necrosis de la médula espinal.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>43 cm</b>
<b>CASO N°</b>	<b>I-259/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>48.5 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>36.8 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>40.6 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>11.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 18 de Julio de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 451/03), procedente de El Hierro, con una historia clínica de anzuelo en esófago, herida en la comisura bucal por nylon. Tras realizar una esofagotomía cervical para la extracción del anzuelo el animal no se despierta de la anestesia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró un edema generalizado, así como falta de osificación en caparazón y plastrón. Se observó una severa necrosis de la mucosa oral en la comisura bucal izquierda. El esófago se mostró perforado con presencia de una fístula esofágica con material purulento. El tracto intestinal se mostró dilatado con presencia de abundante contenido líquido. Ambos riñones se mostraron con severo edema. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa estomatitis necrótica</li> <li>- Severa esofagitis purulenta</li> <li>- Severa hepatitis granulomatosa multifocal (microgranulomas)</li> <li>- Severa enteritis catarral</li> </ul> <p>Severa nefritis intersticial y edema perirrenal</p>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e hígado demostró el aislamiento de <i>Citrobacter freundii</i> y de <i>Enterobacter agglomerans II</i>.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa estomatitis necrótica (nylon)</li> <li>- Severa esofagitis purulenta con perforación de esófago (anzuelo)</li> <li>- Severa hepatitis granulomatosa multifocal (microgranulomas)</li> <li>- Severa enteritis catarral</li> <li>- Severa nefritis intersticial y edema perirrenal</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Este animal presentó las lesiones típicas de una ingestión de anzuelo con perforación de esófago y posterior septicemia por <i>Citrobacter freundii</i> y <i>Enterobacter agglomerans I</i> como demuestra su aislamiento a partir de hígado (hepatitis granulomatosa multifocal) y bazo..</p>			



<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>57 cm</b>
<b>CASO Nº</b>	<b>I-260/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>62.5 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>52 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>61 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>22 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 20 de Julio de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 463/03), con una historia clínica de anzuelo en esófago con nylon asomando por el pico y enredado en extremidad delantera derecha. Historia clínica de colisión con varias fracturas en la cabeza y en el caparazón dejando al descubierto la superficie pleural (Fig. 4.8). Heridas abiertas en cuello y región mandibular. Dada la imposibilidad de su recuperación se procede a su eutanasia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa fractura en la parte derecha del caparazón, dejando al descubierto la superficie pleural, estando ésta muy engrosada. En el esófago se observó un anzuelo con perforación esofágica (Fig. 4.9). Se observó un monofilamento de pesca llegando hasta intestino posterior, con síndrome de cuerpo extraño lineal, edematización de la pared intestinal, con erosiones y material purulento en la mucosa intestinal. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa pleuritis granulomatosa, con presencia de células gigantes multinucleadas.</li> <li>- Severa esofagitis purulenta</li> <li>- Severa enteritis fibrinonecrótica</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de pulmón, bazo e hígado demostró el aislamiento de <i>Aeromonas</i> sp. y de <i>Enterobacter</i> sp.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa pleuritis granulomatosa</li> <li>- Severa esofagitis purulenta (anzuelo)</li> <li>- Severa enteritis fibrinonecrótica (síndrome de cuerpo extraño lineal)</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Este animal presentó las lesiones típicas de una ingestión de anzuelo con perforación de esófago y síndrome de cuerpo extraño lineal por monofilamento de pesca. Además el traumatismo de caparazón afectó severamente al pulmón derecho dada su localización anatómica. El aislamiento de <i>Aeromonas</i> sp. y de <i>Enterobacter</i> sp. a partir de hígado, bazo y pulmón es indicativo de una proceso septicémico.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>51 cm</b>
<b>CASO Nº</b>	<b>I-261/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>55 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>43.5 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>55 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>17.15 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 9 de Agosto de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 525/03), procedente de Fuerteventura, con una historia clínica de fractura abierta longitudinal de caparazón, interesando a pulmón, por lo que dada la imposibilidad de recuperación se procede a su eutanasia</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa fractura en la parte izquierda del caparazón (Fig. 4.10), interesando al pulmón izquierdo, con reacción fibrosa y fibrinosa en pleura, y edema en pleura y pared costal (Fig. 4.11). Además de las lesiones típicas observadas en epicardio y vasos sanguíneos debido a la eutanasia con barbitúricos, se observó la presencia de edema y hematoma en riñón izquierdo. En el aparato digestivo se observó una gran cantidad de contenido. Se observaron numerosas larvas enquistadas de <i>Anisakis</i> en superficie hepática, membrana celómica y serosa gástrica. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa pleuritis granulomatosa</li> <li>- Severas hemorragias renales y edema perirrenal (riñón izquierdo)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo, hígado y pulmón demostró el aislamiento de <i>Proteus mirabilis</i> en hígado y pulmón.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa fractura abierta del caparazón (parte izquierda del caparazón)</li> <li>- Severa pleuritis granulomatosa</li> <li>- Severas hemorragias renales y edema perirrenal (riñón izquierdo)</li> <li>- Moderada perihepatitis asociada con la presencia de larvas de nematodos en la cápsula hepática.</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las lesiones observadas en este animal son las típicas de una fractura abierta en el caparazón, con afectación órganos vitales como pulmón y riñón dada la localización anatómica de los mismos. Además, el aislamiento de <i>Proteus mirabilis</i> en hígado y pulmón demuestran un estado septicémico.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-262/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>42 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>33.5 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>macho</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>41 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágico</b>	Peso	<b>8.45 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 15 de Agosto de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágico macho de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) procedente de Tenerife (Ref. CRFST 548/03), con una historia clínica de caquexia, queratoconjuntivitis purulenta bilateral y ausencia de las dos extremidades delanteras. Dada la imposibilidad de su recuperación se procede a su eutanasia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa queratoconjuntivitis purulenta bilateral sin afectación de las glándulas excretoras de sal. En el aparato digestivo se observó la presencia de plástico a nivel intestinal, sin observarse signos de obstrucción. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos, salvo las ocasionadas por la eutanasia con barbitúricos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa queratoconjuntivitis purulenta</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
-			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
- Severa queratoconjuntivitis purulenta			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Aunque no se observaron severas lesiones orgánicas en este animal, la ausencia de ambas extremidades delanteras justifica su eutanasia por irrecuperable.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-264/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>61 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>51.2 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>58.3 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	<b>Peso</b>	<b>19.15 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 27 de Agosto de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) con una historia clínica de emaciación y severa deshidratación, conjuntivitis y blefaritis bilateral (Ref. CRFST 616/03).</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa caquexia con hundimiento del plastrón. Las principales lesiones fueron observadas a nivel ocular y periocular consistentes en una severa blefaritis y conjuntivitis purulenta bilateral junto a una severa adenitis purulenta de ambas glándulas excretoras de sal (Fig.4.12). Asimismo se observó la presencia de abundante material purulento en glotis y tráquea. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos analizados.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa adenitis purulenta (glándula excretora de sal) caracterizada por la presencia de heterófilos y células gigantes multinucleadas</li> <li>- Severa traqueitis purulenta</li> <li>- Severa queratoconjuntivitis purulenta</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo, hígado, glotis y glándula de sal demostró el aislamiento de <i>Staphylococcus lentus</i> a partir de glotis y glándula de sal y de <i>E. coli</i> a partir de los cuatro órganos analizados.</p> <p>El <b>estudio parasitológico</b> del contenido gastrointestinal resultó negativo.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa adenitis purulenta (glándula de sal) de etiología bacteriana.</li> <li>- Severa traqueitis purulenta de etiología bacteriana.</li> <li>- Severa queratoconjuntivitis purulenta de etiología bacteriana.</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las glándulas excretoras de sal pertenecen al sistema excretor de estos animales y regulan las concentraciones internas de diversos iones, por lo que una alteración funcional de las mismas provoca severas alteraciones en la homeostasis de electrolitos. Aunque existen descripciones de un síndrome vírico (herpesvirus) afectando a ojo, tráquea y pulmón (LET disease), en este caso no se observaron cuerpos de inclusión víricos, por lo que se concluye que el agente etiológico involucrado es <i>Staphylococcus lentus</i>.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-265/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>49 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>41 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>50.5 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>13.4 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 9 de Septiembre de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 647/03), con una historia clínica de fractura humeral de ambas extremidades delanteras, con pérdida de masa muscular. También presentó un anzuelo pequeño en la extremidad delantera izquierda. Dada la imposibilidad de recuperación se procede a su eutanasia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró severas fracturas humerales abiertas en ambas extremidades delanteras, con presencia de material purulento y necrosis de los tejidos subyacentes. Además de las lesiones típicas observadas en epicardio y vasos sanguíneos debido a la eutanasia con barbitúricos, se observó la presencia de numerosas larvas de nematodos en la mucosa y serosa gástrica. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa miositis necrótico-purulenta (extremidades delanteras)</li> <li>- Severa parasitosis gástrica por nematodos con reacción granulomatosa en submucosa gástrica.</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
-			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa fractura humeral abierta bilateral</li> <li>- Severa miositis necrótico-purulenta (extremidades delanteras)</li> <li>- Severa parasitosis gástrica por nematodos</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las fracturas observadas en este animal, con necrosis severa de masas musculares subyacentes, justifican la eutanasia de la tortuga por irrecuperable.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO N°</b>	<b>I-267/03</b>	Longitud curva del caparazón	56 cm
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	46 cm
<b>SEXO</b>	<b>macho</b>	Ancho curvo del caparazón	55 cm
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	20.4 Kg
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 23 de Septiembre de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil macho de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 662/03), procedente de El Hierro, con una historia clínica de colisión con fractura del tabique nasal, rama mandibular derecha y paladar, por lo que dada la imposibilidad de recuperación se procede a su eutanasia</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró severas lesiones traumáticas afectando a la rama mandibular derecha, región orbicular, paladar y región nasal. Además de las lesiones típicas observadas en epicardio y vasos sanguíneos debido a la eutanasia con barbitúricos, se observaron larvas de nematodos en la superficie hepática de ambos lóbulos hepáticos. En el aparato digestivo se observó la presencia de varias cuerdas en el intestino posterior. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa osteitis (región orbicular)</li> <li>- Moderada perihepatitis asociada con la presencia de larvas de nematodos en la cápsula hepática.</li> <li>- Moderada enteritis catarral (intestino posterior)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e hígado demostró el aislamiento de <i>Klebsiella pneumoniae ozaenae</i> y de <i>E. coli</i>.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severo traumatismo (rama mandibular derecha, región orbicular, paladar y región nasal).</li> <li>- Moderada perihepatitis asociada con la presencia de larvas de nematodos en la cápsula hepática.</li> <li>- Moderada enteritis catarral (intestino posterior) (cuerpo extraño)</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>El grado de severidad de las lesiones traumáticas observadas en este ejemplar a nivel craneal justifican la eutanasia del animal debido a su inviabilidad. Además, el aislamiento de <i>Klebsiella pneumoniae ozaenae</i> y <i>E. coli</i> a partir de hígado y bazo demuestran un estado septicémico.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-268/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>51 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>39.3 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>50 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>11.2 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 8 de Octubre de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, UPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 722/03), procedente de Tenerife, con una historia clínica de caquexia, debilidad, queratoconjuntivitis purulenta y posible neumonía sin responder al tratamiento antibiótico empleado.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró depósito de abundante cantidad de material fibrinoso sobre la superficie del lóbulo hepático izquierdo. También se observaron larvas de nematodos en la superficie hepática del lóbulo derecho y sobre la serosa gástrica e intestinal. Se observó una severa adenitis purulenta bilateral afectando a ambas glándulas excretoras de sal, así como una severa queratoconjuntivitis purulenta bilateral. A nivel del aparato respiratorio se observó la presencia de concreciones purulentas en las luces bronquiales. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa</li> <li>- Moderada perihepatitis granulomatosa asociada con la presencia de larvas de nematodos en la cápsula hepática.</li> <li>- Severa adenitis purulenta (glándula de sal)</li> <li>- Severa queratoconjuntivitis purulenta</li> <li>- Severa bronconeumonía purulenta</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de hígado, pulmón y glándula de sal demostró el aislamiento de <i>Staphylococcus sp.</i>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa</li> <li>- Moderada perihepatitis granulomatosa asociada con la presencia de larvas de nematodos en la cápsula hepática.</li> <li>- Severa adenitis purulenta (glándula de sal) de etiología bacteriana</li> <li>- Severa queratoconjuntivitis purulenta</li> <li>- Severa bronconeumonía purulenta de etiología bacteriana</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
El animal presentó severas lesiones afectando a ambas glándulas excretoras de sal, glándulas que regulan la homeostasis interna en cuanto a concentración de electrolitos. Es relativamente frecuente la observación de estas lesiones asociadas a queratoconjuntivitis y neumonía. No se observaron indicios de infección vírica por herpesvirus.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>41 cm</b>
<b>CASO N°</b>	<b>I-271/03</b>	Longitud curva del caparazón	<b>41.5 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>38 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>40 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	Peso	<b>6 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 30 de Octubre de 2003 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 220/03), sin historia clínica.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa lesión de enmallamiento en la extremidad delantera derecha. Las principales lesiones se observaron a nivel digestivo, consistentes en una perforación de estómago en la curvatura menor debido a la presencia de un anzuelo, con presencia de material purulento y reacción fibrosa. Se observó una severa intususcepción intestinal con necrosis de la mucosa intestinal y presencia en la luz intestinal de tanza y un muelle metálico. No se observaron parásitos. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa dermatitis y miositis purulenta (extremidad delantera derecha)</li> <li>- Severa perforación gástrica y severa gastritis purulenta</li> <li>- Severa enteritis necrótica (segmento intestinal intususcepcionado)</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo, hígado e intestino demostró el aislamiento de <i>Staphylococcus xylosus</i> .			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa dermatitis y miositis purulenta (extremidad delantera derecha)</li> <li>- Severa perforación gástrica (anzuelo) y severa gastritis purulenta</li> <li>- Severa enteritis necrótica (segmento intestinal intususcepcionado)</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las lesiones observadas en este ejemplar son las típicas de un caso severo de ingestión de anzuelo y monofilamento de pesca (perforación de estómago, síndrome de cuerpo extraño lineal e intususcepción intestinal) y septicemia posterior.			



<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
<b>CASO N°</b>	<b>I-08/04</b>	Longitud curva del caparazón	<b>60 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga verde</b> ( <i>Chelonia mydas</i> )	Ancho recto del caparazón	<b>48 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>59 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>21 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 13 de Enero de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga verde ( <i>Chelonia mydas</i> ) con una historia clínica de deformación del caparazón y diarrea.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa deformación del caparazón, con presencia de abundante líquido filante en cavidad celómica. En el intestino posterior se observó una impactación por algas afectando a 1.5 metros de tracto intestinal. La pared gástrica de la región pilórica se mostró edematizada. En la cloaca se observó la presencia de numerosos plásticos y monofilamentos de pesca. El hígado se encontró desplazado cranealmente y con tamaño menor del esperado. Ambos riñones mostraron una consistencia firme con indicios de fibrosis. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa nefritis granulomatosa multifocal con presencia de células gigantes multinucleadas</li> <li>- Severa fibrosis intersticial renal</li> <li>- Severa edematización de la lámina propia y submucosa intestinal</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
- El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo, hígado y riñón demostró el aislamiento <i>Candida guilliermondi</i> a partir de riñón.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa nefritis granulomatosa multifocal asociada a levaduras</li> <li>- Severa fibrosis intersticial renal</li> <li>- Severa edematización de la lámina propia y submucosa intestinal</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las principales lesiones observadas en este ejemplar corresponden a lesiones a nivel renal asociadas a una infección por <i>Candida guilliermondi</i> . La impactación intestinal y la presencia de cuerpos extraños a nivel cloacal pudieran ser el origen de la infección.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-36/04</b>	Longitud curva del caparazón	54.5 cm
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	31.8 cm
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	41.2 cm
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	12.3 Kg
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 12 de Abril de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) procedente de Tenerife (Ref. CRFST 171/04), con una historia clínica de deshidratación, y enmallamiento en extremidad delantera derecha.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró severas lesiones en el tracto intestinal consistentes en ulceraciones multifocales con edematización de la pared intestinal y presencia de abundante contenido líquido. La extremidad delantera derecha mostró una severa dermatitis y miositis necrótico-purulenta. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa enteritis ulcerativa fibrinosa</li> <li>- Severa edematización de la pared intestinal</li> <li>- Severa miositis necrótico-purulenta (extremidad delantera derecha)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
-			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa enteritis ulcerativa fibrinosa</li> <li>- Severa miositis necrótico-purulenta (enmallamiento extremidad delantera derecha)</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las principales lesiones observadas en este ejemplar corresponden a lesiones a nivel intestinal, siendo éstas las relacionadas con la muerte del animal.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-108/04</b>	Longitud curva del caparazón	<b>34 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>25 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>32 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	<b>Peso</b>	<b>3.95 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 2 de Febrero de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 18/04) procedente de Fuerteventura, con una historia clínica de enmallamiento con necrosis distal en extremidad delantera derecha y amputación posterior.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró abundante cantidad de líquido en la cavidad celómica con presencia de flóculos de fibrina. Los vasos mesentéricos se mostraron muy congestivos. Se observó una torsión intestinal en intestino posterior, con necrosis de la mucosa. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa enteritis necrótica</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>- El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de hígado y bazo resultó negativo en ambos casos.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa enteritis necrótica (torsión intestinal)</li> <li>- Severa celomitis fibrinosa</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>La muerte del animal se relaciona con la torsión intestinal observada produciendo una necrosis de la mucosa intestinal y una celomitis fibrinosa.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>45 cm</b>
<b>CASO N°</b>	<b>I-109/04</b>	Longitud curva del caparazón	<b>50 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>38 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>46 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>13.2 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 6 de Mayo de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 155/04), con una historia clínica de herida en la comisura bucal y ascitis hemorrágica y enteritis.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró un estado congestivo generalizado. Se observó la presencia de abundante contenido líquido y gaseoso en el tracto intestinal, así como severas hemorragias en la mucosa gástrica. En la luz bronquial se observó abundante contenido mucoso. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa gastritis hemorrágica</li> <li>- Moderada bronconeumonía purulenta</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
-			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa gastritis hemorrágica</li> <li>- Moderada bronconeumonía purulenta</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las lesiones observadas en este ejemplar pudieran deberse a una historia clínica de ingestión de monofilamento de pesca dadas las lesiones a nivel gástrico e intestinal. Las lesiones pulmonares aunque de carácter moderado pudieran haber sido determinantes en la muerte del animal tras la anestesia.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>56 cm</b>
<b>CASO Nº</b>	<b>I-110/04</b>	Longitud curva del caparazón	<b>60 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>46 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>57 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>21 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
Con fecha 7 de Mayo de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> ) (Ref. CRFST 653) sin historia clínica.			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró una severa degeneración hepática. Se observaron numerosas larvas de nematodos en la serosa del estómago. Ambos pulmones se mostraron moderadamente consolidados. El animal mostró una severa adenitis purulenta bilateral en las glándulas excretoras de sal. No se observaron lesiones en el resto de órganos.			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa degeneración hepática vacuolar</li> <li>- Moderada bronconeumonía purulenta</li> <li>- Severa adenitis purulenta bilateral (glándula de sal)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
- El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de glándula de sal demostró el aislamiento de <i>Staphylococcus</i> sp.			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa degeneración hepática vacuolar</li> <li>- Moderada bronconeumonía purulenta</li> <li>- Severa adenitis purulenta bilateral (glándula de sal)</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
Las principales lesiones observadas en este ejemplar son las observadas a nivel de ambas glándulas excretoras de sal responsables del equilibrio electrolítico interno.			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	<b>46 cm</b>
<b>CASO N°</b>	<b>I-123/04</b>	Longitud curva del caparazón	<b>50 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>41 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>48 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil</b>	Peso	<b>11.3 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 1 de Junio de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 330/04), con una historia clínica de queratoconjuntivitis derecha y anzuelo en intestino. Celiotomía inguinal: se extraen 26 cm de nylon y parte del anzuelo. Muere a las pocas horas.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró abundante líquido serosanguinolento en cavidad celómica. Se observó la presencia de un absceso en la pared esofágica interesando a la musculatura cervical. En el tracto intestinal se observó una severa intususcepción intestinal. La mucosa intestinal se mostró necrótica, con presencia de anzuelo y 50 cm de nylon. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderada queratoconjuntivitis purulenta</li> <li>- Severa enteritis necrótica (segmento intususcepcionado)</li> <li>- Severa esofagitis purulenta (absceso)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>- El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo, hígado, intestino anterior e intestino posterior demostró el aislamiento de <i>Pseudomonas cepacia</i> partir de bazo y los dos tramos intestinales.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Moderada queratoconjuntivitis purulenta</li> <li>- Severa enteritis necrótica (segmento intususcepcionado)</li> <li>- Severa esofagitis purulenta (absceso: anzuelo)</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las principales lesiones observadas en este ejemplar corresponden a lesiones a nivel intestinal (enteritis necrótica del segmento intususcepcionado) debido a la ingestión del monofilamento de pesca. El aislamiento de <i>Pseudomonas cepacia</i> a partir de bazo es indicativo de un proceso septicémico.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
		Longitud recta del caparazón	-
<b>CASO Nº</b>	<b>I-128/04</b>	Longitud curva del caparazón	-
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga laúd (<i>Dermochelys coriacea</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	-
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	-
<b>EDAD</b>	-	<b>Peso</b>	<b>231.5 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 23 de Junio de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar hembra de tortuga laúd (<i>Dermochelys coriacea</i>) procedente de Tenerife con una historia clínica de enmallamiento de la aleta delantera (Fig. 4.13) y erosiones en caparazón.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró un edema generalizado y hemorragia en la cavidad celómica. El pulmón izquierdo mostró abundantes nódulos de consistencia sólida con material purulento. El tracto digestivo se encontró vacío salvo por la presencia de 2 picos de cefalópodos. En el intestino anterior se observó la presencia de un pequeño divertículo con material purulento en su interior. Ambos riñones se mostraron edematosos y con áreas de degeneración, friables. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa nefritis intersticial, con presencia de numerosos heterófilos, y áreas de necrosis del parénquima renal. Edematización perirrenal.</li> <li>- Severa neumonía granulomatosa multifocal con presencia de células gigantes multinucleadas asociadas a colonias bacterianas.</li> <li>- Severa enteritis necrótica con presencia de células gigantes multinucleadas (divertículo)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>- El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de hígado, bazo, pulmón y riñón demostró el aislamiento de <i>Serratia marcescens</i>.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa nefritis intersticial, y necrosis renal multifocal.</li> <li>- Severa neumonía granulomatosa multifocal de etiología bacteriana.</li> <li>- Severa enteritis necrótica (divertículo)</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las principales lesiones observadas en este ejemplar son las observadas a nivel renal y pulmonar. El aislamiento de <i>Serratia marcescens</i> a partir de las muestras analizadas es indicativo de una septicemia.</p>			

<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
<b>CASO Nº</b>	<b>I-131/04</b>	Longitud curva del caparazón	<b>31 cm</b>
<b>ESPECIE</b>	<b>Tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>)</b>	Ancho recto del caparazón	<b>30 cm</b>
<b>SEXO</b>	<b>hembra</b>	Ancho curvo del caparazón	<b>34 cm</b>
<b>EDAD</b>	<b>juvenil pelágica</b>	<b>Peso</b>	<b>4 Kg</b>
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 30 de Junio de 2004 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágica hembra de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 295/04) con una historia clínica de mordedura de tiburón en la región caudal, con deformación del caparazón, ausencia del globo ocular izquierdo y severa anemia. Dada la imposibilidad de recuperación se procede a su eutanasia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró ausencia del riñón izquierdo coincidiendo con la zona de la lesión provocada por la mordedura. El riñón derecho mostró una consistencia firme, con fibrosis. Se observaron larvas de nematodos en la cápsula hepática del lóbulo derecho. una severa degeneración hepática. Todo el tracto digestivo mostró un abundante contenido líquido con restos sólidos. Se observaron las típicas lesiones provocadas por el barbitúrico utilizado en la anestesia en corazón y vasos sanguíneos. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa fibrosis renal (riñón derecho)</li> <li>- Moderada perihepatitis granulomatosa (larvas de nematodos)</li> <li>- Moderada enteritis catarral</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>- El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de hígado y bazo demostró el aislamiento de <i>Klebsiella oxitoca</i> en bazo.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa fibrosis renal (riñón derecho) y ausencia de riñón izquierdo</li> <li>- Moderada perihepatitis granulomatosa (larvas de nematodos)</li> <li>- Moderada enteritis catarral</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las principales lesiones observadas en este ejemplar son las observadas a nivel excretor, con ausencia del riñón izquierdo debido a la mordedura de tiburón y lesiones consistentes en severa fibrosis en el riñón derecho.</p>			



<b>INFORME DE NECROPSIA</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS</b>		<b>DIMENSIONES Y PESO</b>	
			Longitud recta del caparazón
CASO N°	I-470/05	Longitud curva del caparazón	34.4 cm
ESPECIE	Tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> )	Ancho recto del caparazón	27.8 cm
SEXO	macho	Ancho curvo del caparazón	33.5 cm
EDAD	juvenil pelágico	Peso	4.5 Kg
<b>HISTORIA CLÍNICA</b>			
<p>Con fecha 30 de Noviembre de 2005 se recibe en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria, ULPGC, un ejemplar juvenil pelágico macho de tortuga boba (<i>Caretta caretta</i>) (Ref. CRFST 1562/05), con una historia clínica de enmallamiento, con amputación de extremidades delantera y trasera derechas. El animal muere en la anestesia.</p>			
<b>LESIONES MACROSCÓPICAS</b>			
<p>Practicada la <b>necropsia</b> el animal mostró abundante presencia de material fibrinoso de color amarillo y consistencia sólida en la cavidad celómica entre las asas intestinales. El hígado presentó presencia de fibrina adherida a la superficie del lóbulo hepático derecho. El tracto gastrointestinal se mostró sin contenido. No se observaron parásitos macroscópicamente. No se observaron lesiones en el resto de órganos.</p>			
<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>			
<p>El <b>estudio histopatológico</b> demostró las siguientes lesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa serositis fibrinosa (serosa tracto intestinal)</li> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa (lóbulo hepático derecho)</li> </ul>			
<b>ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y PARASITOLÓGICO</b>			
<p>- El <b>estudio microbiológico</b> a partir de muestras de bazo e hígado demostró el aislamiento <i>Aeromonas hydrophila</i> a partir de ambos órganos.</p>			
<b>DIAGNÓSTICO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Severa serositis fibrinosa de etiología bacteriana</li> <li>- Severa perihepatitis fibrinosa de etiología bacteriana</li> </ul>			
<b>COMENTARIO</b>			
<p>Las principales lesiones observadas en este ejemplar corresponden a lesiones en serosas digestivas (intestino e hígado). El aislamiento de <i>Aeromonas hydrophila</i> a partir de bazo es indicativo de un proceso septicémico, que probablemente resultó en que el animal no superase la anestesia.</p>			



**Fig 4.2.** Tortuga boba (I-82/03) con ingestión de anzuelo y monofilamento de pesca.



**Fig 4.3.** Enteritis necrótico-purulenta en la tortuga boba I-178/03.



**Fig 4.4.** Cloacitis necrótico purulenta en la tortuga boba I-178/03.



**Fig 4.5.** Tortuga boba (I-182/03) mostrando queratoconjuntivitis purulenta.



**Fig 4.6.** Intususcepción gastrointestinal como consecuencia de la ingestión de monofilamento de pesca (tortuga boba I-187/03).



**Fig 4.7.** Tortuga boba de la figura 2 (I-187/03) mostrando gastritis necrótico purulenta y perforación gástrica por anzuelo.





**Fig 4.8.** Tortuga boba (I-260/03) afectada de traumatismo en caparazón, enmallamiento en aleta delantera derecha e ingestión de anzuelo y monofilamento de pesca



**Fig 4.9.** Perforación esofágica en la tortuga I-260/03.



**Fig 4.10.** Tortuga boba (I-261/03) con severo traumatismo en caparazón.



**Fig 4.11.** Severa pleuritis fibrinosa y edema pleural en tortuga (I-261/03)



**Fig 4.12.** Tortuga boba (I-264/03) mostrando severa adenitis purulenta en glándula excretora de sal.



**Fig 4.13.** Tortuga laúd (I-128/04) mostrando lesiones por enmallamiento en aleta delantera

### 4.3 DETECCIÓN DE ORGANOCOLORADOS

Los congéneres de PCBs analizados en las muestras de tejido adiposo y hepático de cada tortuga fueron:

- **2,4,4'-triclorobifenil (28)**
- **2,4',5-triclorobifenil (31)**
- **2,2',5,5'-tetraclorobifenil (52)**
- **2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil (101)**
- **2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil (138)**
- **2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil (153)**
- **2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil (180)**
- **2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decaclorobifenil (209)**

Se analizaron también el **2,4'-dicloro-difenil-tricloro-etano (2,4'-DDT)** y sus metabolitos: **2,4'-dicloro-difenil-dicloro-etano (2,4'-DDD)** y **2,4'-dicloro-difenil-dicloro-etileno (2,4'-DDE)**.

En total se hicieron 232 determinaciones para cada uno de los compuestos organoclorados anteriores, correspondientes a cuatro repeticiones de cada tejido de las 32 tortugas analizadas. De algunas tortugas sólo se pudo analizar uno de los dos tejidos por no obtener cantidad suficiente en el caso del tejido adiposo, o por no presentar las condiciones adecuadas para el análisis en el caso del tejido hepático. Con los cuatro valores obtenidos se calculó la media y la desviación estándar. Los resultados, expresados en µg/kg. de peso húmedo, se muestran en la tabla 4.1.

De las 32 tortugas analizadas, tres no presentaron indicios de organoclorados en los tejidos analizados, aunque de dos de ellas no se pudo analizar el contenido en grasa por resultar imposible la obtención de muestra en el momento de la necropsia debido a las condiciones del animal. Esta circunstancia de no contar con los dos tejidos objetivos del presente estudio se repitió en seis de las tortugas estudiadas, siendo el tejido graso el ausente en cinco de los ejemplares citados y el tejido hepático en uno de los casos, por lo que el cómputo total de ejemplares con el que poder analizar los resultados obtenidos en ambos tejidos se redujo a 26.

**Tabla 4.1** Niveles de organoclorados detectados en tejido adiposo y hepático de tortugas marinas. Los valores representan la media y la desviación estándar ( $\mu\text{g/Kg}$  de peso húmedo).

MUESTRAS		CB180	CB138	CB209	CB153	CB28,31	CB101	CB52	$\Sigma\text{PCB}$	DDE	DDD	DDT	$\Sigma\text{DDT}$
<b>I-110/02</b>	GRAS	MEDIA 35.932	27.461	nd	27.633	2.294	1.924	9.500	104.746	nd	nd	nd	nd
		DESV. 1.216	0.779		0.807	0.698	1.891	6.617					
<b>I-111/02</b>	HIGA	MEDIA nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	67.221	67.221
		DESV. -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.574	-
<b>I-05/03</b>	GRAS	MEDIA 78.044	59.098	nd	93.577	2.108	7.385	5.031	245.244	12.054	798.799	nd	810.853
		DESV. 1.749	3.738		6.167	0.470	0.328	0.979		17.090	74.466		
<b>I-47/03</b>	GRAS	MEDIA 120.496	89.091	nd	nd	nd	nd	nd	209.587	nd	nd	nd	nd
		DESV. 0.040	3.701		nd	nd	nd	nd					
<b>I-52/03</b>	HIGA	MEDIA nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		DESV. -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>I-64/03</b>	GRAS	MEDIA 104.350	nd	nd	nd	nd	nd	nd	104.350	nd	nd	nd	nd
		DESV. 3.929											
<b>I-52/03</b>	HIGA	MEDIA nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	25.752	63.892	nd	89.644
		DESV. -	-	-	-	-	-	-	-	4.398	0.095	-	-
<b>I-64/03</b>	GRAS	MEDIA nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		DESV. -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>I-76/03</b>	HIGA	MEDIA 3087.609	13299.336	14877.485	8244.329	nd	261.813	1012.882	40783.455	nd	nd	nd	nd
		DESV. -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>I-76/03</b>	GRAS	MEDIA nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		DESV. -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DESV.: Desviación Estándar Poblacional; CB: Clorobifenil; DDE:  $\alpha,\beta$ -DDE; DDD:  $\alpha,\beta$ -DDD; DDT:  $\alpha,\beta$ -DDT;  $\Sigma\text{PCB}$ : CB180+CB138+CB209+CB153+CB28,31+CB101+CB52;  $\Sigma\text{DDT}$ :

$\alpha,\beta$ -DDE+ $\alpha,\beta$ -DDD+ $\alpha,\beta$ -DDT. nd: no detectado; -: tejido no analizado.



Tabla 4.1. Niveles de organoclorados detectados en tejido adiposo y hepático de tortugas marinas. Los valores representan la media y la desviación estándar ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . de peso húmedo).

MUESTRAS		CB180	CB138	CB209	CB153	CB28,31	CB101	CB52	$\Sigma$ PCB	DDE	DDD	DDT	$\Sigma$ DDT
I-77/03	GRAS	99.032	69.454	nd	90.201	38.216	14.843	37.871	349.617	nd	12.913	nd	12.913
	DES.	0.428	0.306		0.511	1.465	0.276	1.239			2.436		
I-82/03	HIGA	111.161	88.728	nd	nd	nd	nd	nd	199.889	nd	nd	nd	nd
	DES.	1.221	1.423										
I-178/03	GRAS	nd	nd	70.077	nd	nd	nd	nd	70.077	nd	nd	nd	nd
	DES.												
I-182/03	HIGA	2664.999	nd	6051.520	nd	154.890	nd	284.594	9156.004	nd	nd	nd	nd
	DES.												
I-187/03	GRAS	135.161	55.318	nd	62.481	3.144	11.733	8.857	276.695	nd	nd	nd	nd
	DES.												
I-188/03	HIGA	747.677	nd	598.575	3411.686	nd	nd	81.053	4838.991	nd	nd	nd	nd
	DES.												
I-189/03	GRAS	69.990	53.418	64.143	53.484	24.646	nd	20.833	286.514	nd	21.657	38.654	60.312
	DES.	0.501	0.110	0.072	0.301	0.313		2.032			4.776	6.662	
I-187/03	HIGA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	26.242	116.819	nd	143.062
	DES.									0.529	34.049		
I-187/03	GRAS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	121.788	327.227	449.015
	DES.										1.942	0.714	
I-188/03	HIGA	145.404	nd	nd	nd	4.687	nd	7.359	157.450	nd	nd	nd	nd
	DES.	3.624				1.221		0.733					
I-188/03	GRAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DES.												
I-188/03	HIGA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	181.890	181.890
	DES.												
I-189/03	GRAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DES.												
I-189/03	HIGA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	DES.												

DES.V.: Desviación Estándar Poblacional; CB: Clorobifenil; DDE:  $\alpha,\beta$ -DDE; DDD:  $\alpha,\beta$ -DDD; DDT:  $\alpha,\beta$ -DDT;  $\Sigma$ PCB: CB180+CB138+CB209+CB153+CB28,31+CB101+CB52;  $\Sigma$ DDT:

$\alpha,\beta$ -DDE+ $\alpha,\beta$ -DDD+ $\alpha,\beta$ -DDT. nd: no detectado; - : tejido no analizado.

Tabla 4.1. Niveles de organoclorados detectados en tejido adiposo y hepático de tortugas marinas. Los valores representan la media y la desviación estándar ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso húmedo).

MUESTRAS		CB180	CB138	CB209	CB153	CB28,31	CB101	CB52	$\Sigma\text{PCB}$	DDE	DDD	DDT	$\Sigma\text{DDT}$
I-259/03	GRAS	MEDIA 145.701	nd	nd	122.877	6.390	1.013	8.573	284.554	nd	nd	95.869	95.869
		DES.V. 1.195			5.666	0.007	1.732	0.900				1.181	
I-260/03	HIGA	MEDIA 233.588	201.082	nd	nd	nd	nd	nd	434.670	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 4.332	19.750										
I-261/03	GRAS	MEDIA 5006.162	2039.390		2603.714	nd	nd	nd	9649.267	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 1806.468	nd	3199.547	15438.710	422.909	nd	709.480	21577.114	nd	nd	nd	nd
I-262/03	HIGA	MEDIA 97.679	nd	nd	527.954	23.311	nd	55.915	704.859	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 3887.605	nd	4900.384	nd	587.093	671.391	811.246	10857.720	nd	nd	nd	nd
I-264/03	GRAS	MEDIA 212.439	nd	nd	55.531	nd	nd	nd	55.531	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 1.503			4.740								
I-265/03	HIGA	MEDIA 90.064	49.483	nd	69.511	5.708	64.261	7.807	286.835	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 5.710	1.412		4.191	1.612	1.645	1.912					
I-267/03	GRAS	MEDIA 85.546	69.113	102.250	76.235	4.490	nd	5.934	343.569	nd	nd	5.920	5.920
		DES.V. 0.718	0.690	1.789	0.523	0.201	1.739	1.739				0.792	
I-267/03	HIGA	MEDIA 227.930	nd	nd	nd	8.674	nd	nd	236.604	nd	89.271	nd	89.271
		DES.V. 3.634				2.059					3.813		

DES.V.: Desviación Estándar Poblacional; CB: Clorobifenil; DDE:  $\text{g.p.}^{\text{g.p.}}$ -DDE; DDD:  $\text{g.p.}^{\text{g.p.}}$ -DDD; DDT:  $\text{g.p.}^{\text{g.p.}}$ -DDT;  $\Sigma\text{PCB}$ : CB180+CB138+CB209+CB153+CB28,31+CB101+CB52;  $\Sigma\text{DDT}$ :

$\text{g.p.}^{\text{g.p.}}$ -DDE+ $\text{g.p.}^{\text{g.p.}}$ -DDD+ $\text{g.p.}^{\text{g.p.}}$ -DDT. nd: no detectado; -: tejido no analizado.



Tabla 4.1 Niveles de organoclorados detectados en tejido adiposo y hepático de tortugas marinas. Los valores representan la media y la desviación estándar ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso húmedo).

MUESTRAS		CB180	CB138	CB209	CB153	CB28,31	CB101	CB52	$\Sigma\text{PCB}$	DDE	DDD	DDT	$\Sigma\text{DDT}$
<b>I-268/03</b>	GRAS	MEDIA 117.559	nd	nd	70.284	5.181	nd	8.196	201.221	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 0.788			0.458	0.060		2.202					
<b>I-271/03</b>	HIGA	MEDIA -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DES.V. -											
<b>I-08/04</b>	GRAS	MEDIA 66.034	nd	nd	49.927	nd	84.504	nd	84.504	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 2.972			3.097		2.145		115.961	nd	18.311	nd	18.311
<b>I-108/04</b>	GRAS	MEDIA 72.873	nd	nd	58.042	5.700	nd	7.197	143.813	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 0.098			0.065	0.257		2.163	116.453	nd	nd	250.918	250.918
<b>I-36/04</b>	HIGA	MEDIA 116.453	nd	nd	nd	nd	nd	nd	116.453	nd	nd	47.364	47.364
		DES.V. 1.205							407.444	nd	nd	nd	nd
<b>I-109/04</b>	GRAS	MEDIA 106.489	nd	217.975	82.980	nd	nd	nd	407.444	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 1.142		5.498	14.700				89.755	nd	nd	nd	nd
<b>I-110/04</b>	HIGA	MEDIA nd	nd	89.755	nd	nd	nd	nd	89.755	nd	nd	nd	nd
		DES.V. -		7.736									
<b>I-108/04</b>	GRAS	MEDIA -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DES.V. -											
<b>I-109/04</b>	HIGA	MEDIA 5638.954	nd	5638.954	nd	nd	nd	nd	5638.954	nd	nd	nd	nd
		DES.V. -							63.314	nd	nd	nd	nd
<b>I-110/04</b>	GRAS	MEDIA 83.944	nd	nd	63.314	nd	nd	nd	63.314	nd	nd	nd	nd
		DES.V. 2.927			6.218				154.315	nd	nd	nd	nd
<b>I-110/04</b>	HIGA	MEDIA nd	nd	nd	40.908	nd	nd	nd	40.908	nd	11.665	10.694	22.359
		DES.V. -			10.662				40.908	nd	12.044	0.325	0.325

DES.V.: Desviación Estándar Poblacional; CB: Clorobifenil; DDE:  $\text{p,p}'$ -DDE; DDD:  $\text{p,p}'$ -DDD; DDT:  $\text{p,p}'$ -DDT;  $\Sigma\text{PCB}$ : CB180+CB138+CB209+CB153+CB28,31+CB101+CB52;  $\Sigma\text{DDT}$ :

$\text{p,p}'$ -DDE+ $\text{p,p}'$ -DDD+ $\text{p,p}'$ -DDT. nd: no detectado; -: tejido no analizado.



**Tabla 4.1** Niveles de organoclorados detectados en tejido adiposo y hepático de tortugas marinas. Los valores representan la media y la desviación estándar ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . de peso húmedo).

MUESTRAS	CB180		CB138		CB209		CB153		CB28,31		CB101		CBS2		$\Sigma$ PCB		DDE		DDD		DDT		$\Sigma$ DDT	
	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.	MEDIA	DESV.
<b>I-123/04</b>	GRAS	nd	45.719	1.775	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	45.720	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	HIGA	50.449	0.238	nd	nd	nd	nd	38.411	0.449	nd	nd	nd	nd	nd	nd	88.860	nd	nd	23.406	2.438	nd	nd	23.406	nd
<b>I-128/04</b>	GRAS	nd	nd	nd	501.531	30.067	55.797	20.510	9.651	8.118	nd	nd	nd	nd	nd	628.334	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	HIGA	113.924	12.376	nd	nd	526.283	47.341	251.422	18.588	71.465	6.761	nd	nd	nd	nd	971.755	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>I-131/04</b>	GRAS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	HIGA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>I-470/05</b>	GRAS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	HIGA	79.941	10.548	39.134	4.870	260.643	23.336	36.104	6.219	7.879	4.350	nd	nd	nd	nd	438.088	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

DESV.: Desviación Estándar Poblacional; CB: Clorobifenil; DDE:  $\text{q.p.}-\text{DDE}$ ; DDD:  $\text{q.p.}-\text{DDD}$ ; DDT:  $\text{q.p.}-\text{DDT}$ ;  $\Sigma$ PCB: CB180+CB138+CB209+CB153+CB28,31+CB101+CB52;  $\Sigma$ DDT:

$\text{q.p.}-\text{DDE}+\text{q.p.}-\text{DDD}+\text{q.p.}-\text{DDT}$ . nd: no detectado; -: tejido no analizado.

Los PCBs registraron mayores niveles que los DDTs, así como una mayor frecuencia de aparición en ambos tejidos. Para el caso de los PCBs, los más destacados correspondieron al grupo de los hepta y hexa-cloros, junto con un representante de los deca-cloro para el caso del hígado.

Los mayores niveles obtenidos del  $\Sigma$ PCBs se observaron en el tejido hepático, con un rango que osciló de no detectado (nd) a 40783.455  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , frente a un rango de nd. a 9649.267  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en el tejido adiposo. Los valores medios de cada congénere y total de PCBs se muestran en la Tabla 4.2. No obstante, la frecuencia de detección de los diferentes congéneres resultó mayor en grasa que en hígado, salvo para el congénere 209 que destacó por su elevada afinidad por el tejido hepático y por los elevados niveles registrados (Tabla 4.3).

**Tabla 4.2** Niveles medios obtenidos de los congéneres de PCBs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso húmedo). CB: Clorobifenil.  $\Sigma$ PCB: CB180+CB138+CB209+CB153+CB28,31+CB101+CB52

MEDIAS	CB180	CB138	CB209	CB153	CB28,31	CB101	CB52	$\Sigma$ PCB
GRASA	243.83	92.53	37.26	151.50	4.77	6.60	6.74	543.23
HÍGADO	432.81	441.53	1172.60	893.13	43.37	30.83	94.94	3109.22

**Tabla 4.3** Frecuencia (n° de animales) de detección de los compuestos analizados. CB: Clorobifenil

FRECUENCIA	CB180	CB153	CB28,31	CB52	CB138	CB101	CB209	DDT	DDD	DDE
GRASA	16	16	11	11	9	6	5	5	3	0
HÍGADO	15	10	10	10	5	4	10	4	7	3

Entre los congéneres de PCBs destacaron por sus altos niveles los correspondientes a los números 180, 153 y 138 para ambos tejidos. Si bien es necesario destacar nuevamente el congénere 209 en el caso del hígado por alcanzar los niveles más elevados detectados entre el resto.

Respecto a la frecuencia con la que se detectaron los congéneres en los tejidos, destacaron nuevamente el 180 y 153 como los más elevados en grasa, seguidos por los números 28, 31, 52, 138, 101 y 209. Salvo el caso mencionado del 138, que sí alcanzó niveles destacados, el resto de congéneres mostraron niveles bajos. El orden de frecuencia se mantuvo igual para el caso del hígado, salvo el ya citado congénere 209, que destacó junto a los dos principales detectados en ambos tejidos.

Dentro de los límites de detección el nivel inferior detectado fue 1.013 ppb, representando como nd (no detectado) cualquier valor inferior al mismo. El mayor nivel detectado resultó ser de 15438.71 ppb correspondiente al congénere 153 detectado en hígado.

En el caso de los DDTs destacó el 2,4'-DDT como el de mayor nivel y mayor frecuencia de detección en el tejido adiposo, mientras que el 2,4'-DDD no alcanzó niveles importantes y el 2,4'-DDE no se detectó en ninguna de las muestras. Aun en el caso del 2,4'-DDT, sus niveles fueron de los valores más bajos dentro del grupo de organoclorados (Tabla 4.4).

En el tejido hepático destacó el 2,4'-DDD como el más frecuentemente detectado y con los mayores niveles, confirmando la función metabolizante del tejido. El 2,4'-DDE alcanzó niveles prácticamente inapreciables.

**Tabla 4.4** Niveles medio de DDTs y sus metabolitos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso húmedo). DDE: o,p'-DDE; DDD: o,p'-DDD; DDT: o,p'-DDT;  $\Sigma\text{DDT}$ : o,p'-DDE+o,p'-DDD+o,p'-DDT

MEDIAS	DDE	DDD	DDT	$\Sigma\text{DDT}$
GRASA	0	5.79	20.44	26.23
HÍGADO	2.07	36.20	16.47	54.74

Del total de las muestras siete ejemplares de tortugas destacaron por alcanzar niveles de organoclorados por encima de las 900 ppb (Tabla 4.1). En todos los casos se observaron los mayores niveles en el tejido hepático, registrándose en cinco de ellos niveles muy inferiores o no detectados en el tejido adiposo. Estos mismos ejemplares presentaron un cuadro de septicemia o caquexia, la mayoría en grado severo, y no registraron niveles para el DDT y sus metabolitos. Sólo uno de estos casos destacados, el I-260/03, mostró mayores niveles en grasa que en hígado para los congéneres 180 y 138.

A continuación se analizan brevemente cada uno de los compuestos estudiados. Los niveles medios obtenidos de los congéneres de PCBs se muestran en la Figura 4.15. Los niveles medios de los grupos bifenilos en la Figura 4.16. La frecuencia de los grupos bifenilos en la Figura 4.17. Los niveles medios obtenidos en el análisis del DDT y sus metabolitos se representan en la Figura 4.18.

#### 4.3.1. PCB 180

El congénere 180 o 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenilo representó uno de los congéneres más frecuentemente detectados en ambos tejidos. Se detectó en el tejido adiposo del 50 % de las tortugas analizadas y en el hígado del 46,8 % de los ejemplares. Alcanzó un nivel máximo de 5006.16 ppb en grasa y 3887.60 ppb en hígado. Fue el único congénere de PCBs con un mayor nivel detectado en grasa que en hígado, aunque la media para el total de las tortugas analizadas fue mayor en hígado. Los valores de 243.83 ppb  $\pm$  918.95 para el tejido graso, y de 432.82 ppb  $\pm$  967.44 para el hígado, lo sitúan como el de mayor nivel detectado en grasa y el cuarto en orden de importancia en hígado.

#### 4.3.2. PCB 153

El 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo fue el segundo en importancia en ambos tejidos, tanto por su frecuencia de detección como por los elevados niveles detectados. Compartió con el congénere 180 el 50 % de frecuencia de detección en las tortugas analizadas en el tejido adiposo, pero sin llegar a igualar sus niveles. Presentó un valor máximo de 2603 ppb para este tejido. Su frecuencia de aparición en el hígado fue de un 31.25 % de las tortugas estudiadas. En hígado sus niveles superaron con diferencias los detectados en grasa, llegando a un valor máximo de 15438.71 ppb, siendo el mayor nivel registrado en el total de las muestras. La concentración media para el tejido adiposo fue de 151,50 ppb  $\pm$  482,19, mientras que en el hígado se alcanzó una media de 893,13 ppb  $\pm$  3027,58.

#### 4.3.3. PCB 209

El congénere 209: 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decaclorobifenilo destacó de manera importante en el tejido hepático. Aun siendo un congénere habitualmente no citado en la bibliografía relacionada con la detección de organoclorados en animales, los valores detectados y su elevada frecuencia de aparición en nuestro estudio son especialmente relevantes. Se detectó en un 31.25 % del total de las muestras y mostró el mayor valor detectado para la media del total de los compuestos analizados, 1172.60 ppb  $\pm$  2969.31. Su mayor nivel registrado en el tejido hepático fue de 14877.48 ppb. Su aparición en este tejido y los niveles observados parecen tener relación con el estado caquético y septicémico de las tortugas, reflejando los mayores niveles los estados más severos de caquexia observados. Por el contrario, en el tejido adiposo fue uno de los de menor

importancia atendiendo a la frecuencia de detección. Tan sólo se detectó en un 15.62 % de las muestras, con un nivel máximo de 501.53 ppb. La media detectada en el tejido adiposo fue de 37.26 ppb  $\pm$  110.93. Aunque su frecuencia de detección fue mucho menor en grasa, cada vez que se detectó presentó niveles comparables a los congéneres de mayor valor, siendo en la mayoría de los casos, el de mayor valor. En ambos tejidos frecuentemente se detectó junto a otros congéneres, salvo en sólo dos casos (uno en tejido hepático y otro en grasa), en los que fue el único congénere detectado.

#### **4.3.4. PCB 138**

El 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenilo destacó por los altos niveles detectados principalmente en hígado, con un máximo de 13299.33 ppb para este tejido, y de 2039 ppb en grasa. A pesar de la gran diferencia entre ambos tejidos, resultó el tercero en orden de valores detectados. La media para el tejido adiposo fue de 92.54 ppb  $\pm$  375.91, y de 441.53  $\pm$  2310.86 para el hígado. Resultó uno de los congéneres menos frecuentemente detectados (28.12 % en grasa y 15.62 % en hígado). Los niveles más elevados detectados en hígado correspondieron, al igual que lo sucedido con el congénere 209, con tortugas caquéticas o afectadas de septicemia, correspondiendo el mayor valor con un grado de caquexia severa. En el caso del tejido adiposo no se observó la misma correlación. En el único caso detectado en ambos tejidos para la misma tortuga el nivel fue mayor en hígado, detectándose en el resto de tortugas tan sólo en uno de ambos tejidos.

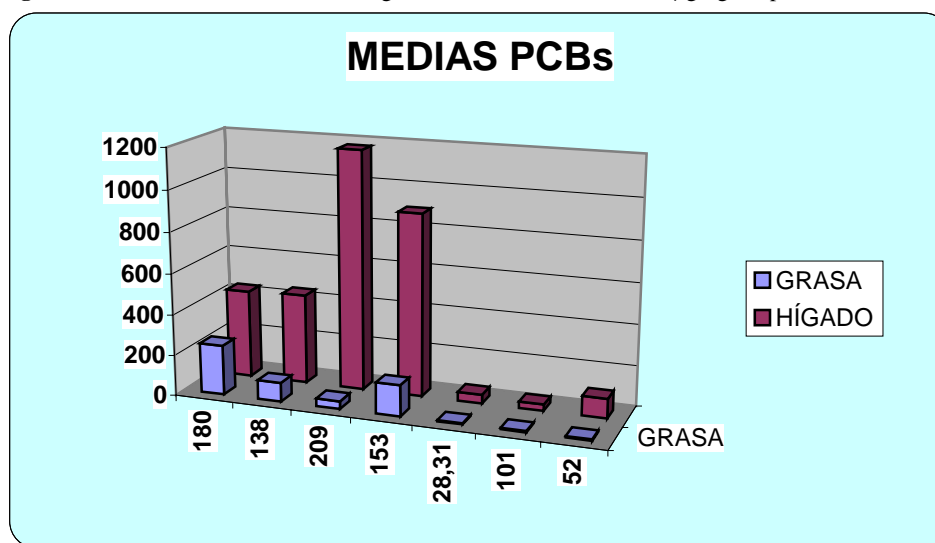
#### **4.3.5. PCBs 28, 31, 52**

El 2,4,4'-triclorobifenilo (28), el 2,4',5-triclorobifenilo (31) y el 2,2',5,5'-tetraclorobifenilo (52) se detectaron con bastante frecuencia en ambos tejidos (34.37 % en grasa y 25 % en hígado), pero sus niveles siempre resultaron inferiores respecto al resto de congéneres. Los pocos casos en los que alcanzaron niveles más altos correspondieron al tejido hepático. Los congéneres 28 y 31 se analizaron conjuntamente por tener el mismo tiempo de retención en el cromatógrafo de gases como indica el correspondiente patrón externo que los identifica. Las medias en grasa fueron de 6.74 ppb  $\pm$  12.47 (congénere 52) y de 4.77 ppb  $\pm$  8.98 (congéneres 28 y 31) llegando a alcanzar 94.94 ppb  $\pm$  249.75 (congénere 52) y 43.37  $\pm$  125.14 ppb (congéneres 28 y 31) en hígado. Salvo en un caso, siempre fue detectado junto a otros congéneres con mayores niveles.

#### 4.3.6. PCB 101

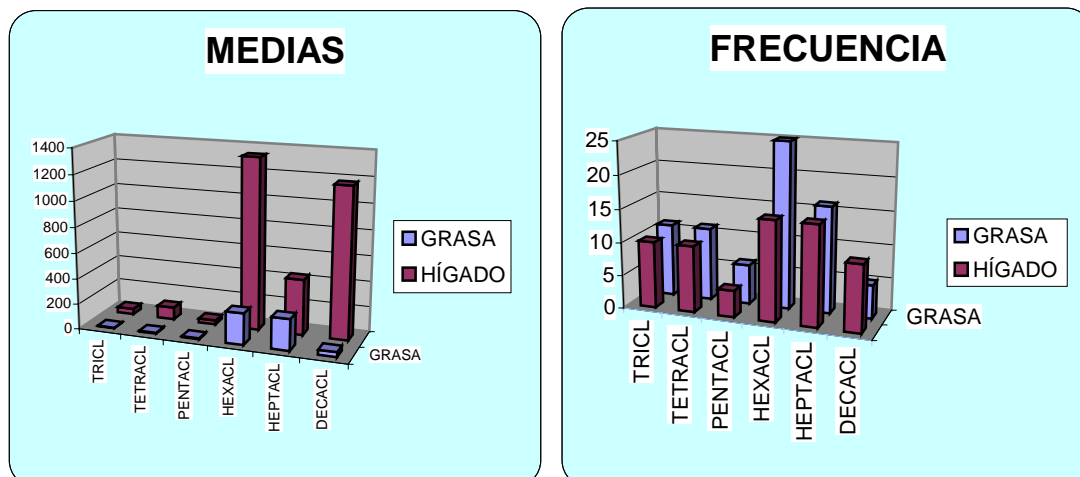
Coincidiendo con la bibliografía consultada el congénere 101 o 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenilo apenas fue detectado en el total de las muestras estudiadas, y cuando se detectó sus niveles fueron muy bajos en ambos tejidos. Se detectó en un 18.75 % del total de las muestras en tejido adiposo y en un 12.5 % en hígado. Su media en grasa fue de  $6.60 \text{ ppb} \pm 19.32$ , y en hígado fue  $30.83 \text{ ppb} \pm 123.76$ , la menor detectada respecto al resto de los congéneres. Al igual que en el caso anterior, salvo en una tortuga, siempre fue detectado junto a otros congéneres con mayores niveles.

**Figura 4.15.** Niveles medios de los congéneres de PCBs, medidos en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . de peso húmedo.



Del análisis anterior es posible concluir que los congéneres bifenilos de los grupos hexa y heptacloros fueron los más frecuentemente detectados y los de mayores niveles detectados, mientras que los congéneres de los grupos tri y tetracloros bifenilos aun siendo frecuentes, no alcanzaron niveles importantes. Destacó en el tejido hepático el congénere 209 como representante de los decacloro bifenilos, con altos niveles y elevada frecuencia de detección. El congénere 101, único representante de los pentacloro bifenilos no destacó por frecuencia ni por niveles importantes. Los resultados se expresan gráficamente en las Figuras 4.16 y 4.17.

Figura 4.16 y 4.17 Valores medios, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . de peso húmedo y frecuencia de grupos bifenilos.



#### 4.3.7. 2,4'-DDT

No fue detectado con mucha frecuencia, tan sólo en un 15.62 % en grasa y en un 12.8 % en hígado. Respecto a sus metabolitos, el 2,4'-dicloro-difenil-tricloro-etano fue el más frecuente y el de mayor nivel en grasa, con una media de  $20.44 \text{ ppb} \pm 64.74$ . En hígado alcanzó una media de  $16.48 \text{ ppb} \pm 53.69$ , media inferior a la detectada para el caso del DDD.

#### 4.3.8. 2,4'-DDD

De este grupo fue el más detectado y el de mayor nivel en el tejido hepático. El 2,4'-dicloro-difenil-dicloro-etano alcanzó una media en hígado de  $36.20 \text{ ppb} \pm 139.66$  y se detectó en un 21.87 % de los casos. En el tejido adiposo apenas se detectó (9.37 %), y cuando se observó sus niveles fueron muy bajo (valor medio de  $5.79 \text{ ppb} \pm 23.20$ ).

#### 4.3.9. 2,4'-DDE

El 2,4'-dicloro-difenil-dicloro-etileno no se detectó en ninguna muestra del tejido adiposo. En el hígado fue detectado tan sólo en un 9.37 % de los casos, y sus niveles no alcanzaron valores elevados (valor medio  $2.07 \text{ ppb} \pm 6.53$ ).

Únicamente en tres casos se detectaron conjuntamente niveles del 2,4'-DDT y 2,4'-DDD, no resultando ninguno para el caso del 2,4'-DDT y el 2,4'-DDE. Esta falta de datos conjuntos hace que no sea posible calcular el ratio del DDT y sus metabolitos.

Figura 4.18. Valores medios obtenidos de DDTs. Medido en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso húmedo.

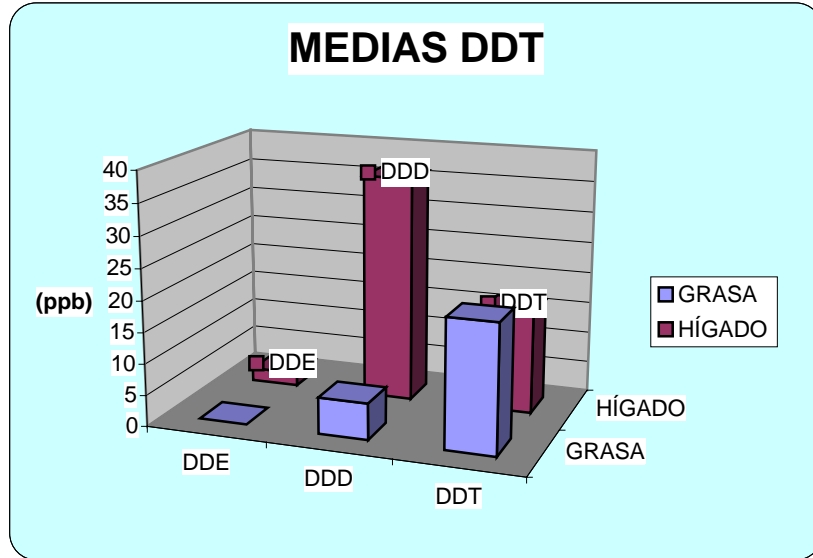
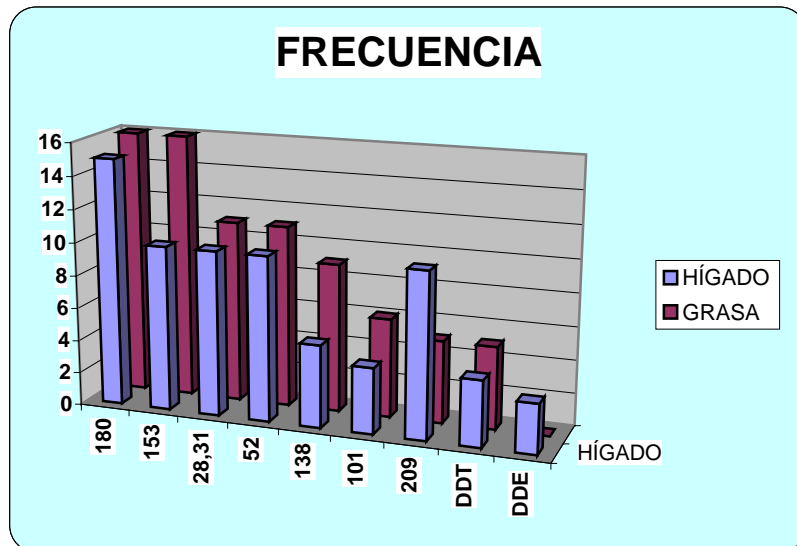


Figura 4.19. Frecuencia de detección de los compuestos analizados en el total de muestras.

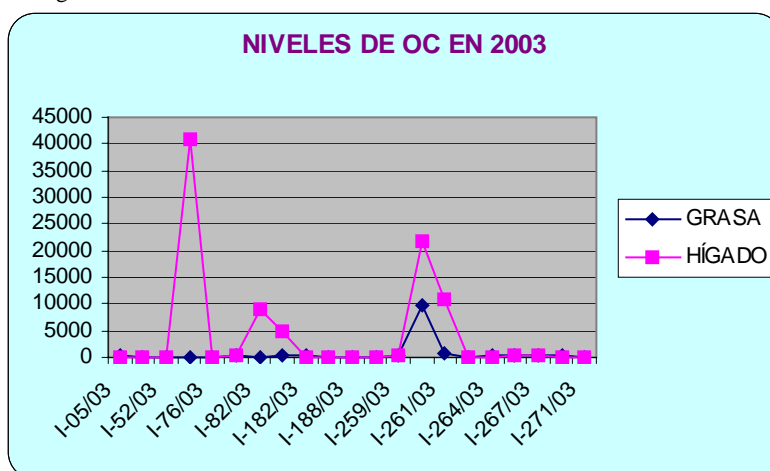


Como se observa en las gráficas, en ambos tejidos predominaron los mismos congéneres de PCBs tanto en frecuencia de detección como en niveles alcanzados, con la excepción del congénere 209 (destacable por los altos niveles detectados y su frecuencia de aparición en el hígado).

La disparidad en el número de muestras que se analizaron cada año no permitió realizar un estudio representativo de comparación de los niveles de organoclorados en las tortugas marinas en los distintos años en los que se llevó a cabo el análisis. No obstante es posible observar la tendencia de los niveles de organoclorados a lo largo del año 2003 (año con un mayor tamaño muestral) (Figura 4.20).



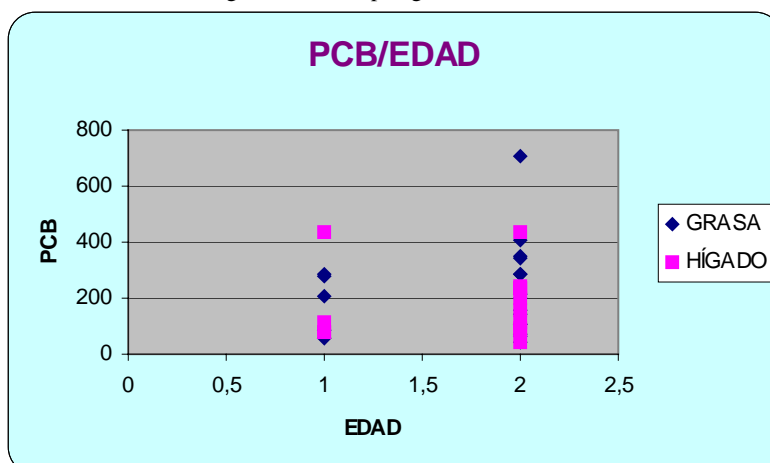
**Figura 4.20.** Niveles de OCs durante el año 2003. Las muestras se exponen en orden de llegada.



Como se puede observar en la Figura 4.20, los niveles de organoclorados no mostraron ninguna tendencia a aumentar ni a disminuir en ninguno de los tejidos estudiados a lo largo del año 2003.

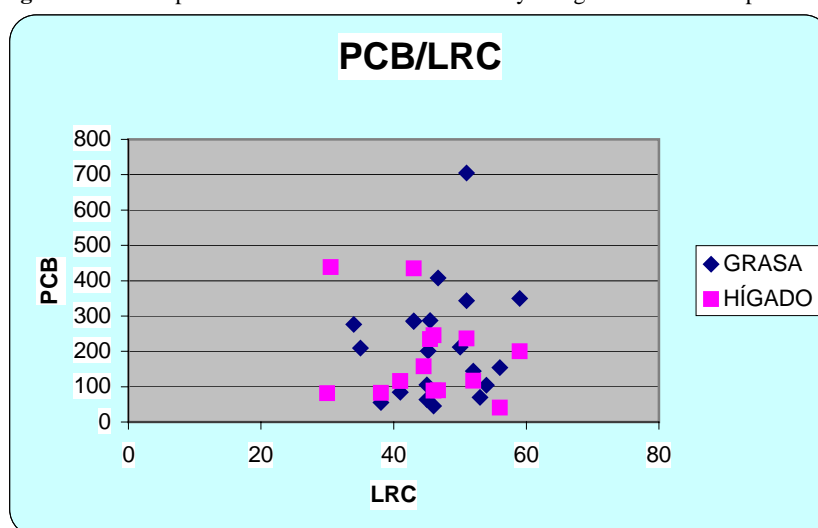
El estudio comparativo entre los niveles de organoclorados en ambos sexos careció de significación por lo dispar del número de muestras para cada sexo. Respecto a la edad, fue posible analizar la diferencia entre tortugas juveniles pelágicas y juveniles, según la clasificación descrita por BJORN DAL *et al.* (2001) y SEMINOFF *et al.* (2004). La gráfica se realizó sin los datos, que según el análisis estadístico descriptivo se encontraban fuera del límite superior para un intervalo de confianza del 95 %. Según nuestros datos, no destacaron diferencias importantes en la concentración de organoclorados entre los individuos juveniles pelágicos y juveniles para ambos tejidos (Figura 4.21).

**Figura 4.21.** Comparación de los niveles de PCBs, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso húmedo, con la edad de las tortugas. 1: Juvenil pelágica; 2: Juvenil.



Los elevados niveles de PCBs que presentaron algunos de los ejemplares estudiados frente al resto, principalmente en las muestras de hígado, impidieron establecer un comportamiento de relación entre los niveles de organoclorados que presentan las tortugas y la longitud recta del caparazón de las mismas, por lo que, igual que en el caso anterior, el estudio se realizó con la exclusión de los datos que quedaban fuera del límite superior definido por la estadística descriptiva para un intervalo de confianza del 95 %. En nuestro caso y para ambos tejidos, no se observó ninguna tendencia a seguir entre los niveles de PCBs detectados y la LRC de las tortugas analizadas (Figura 4.22).

**Figura 4.22.** Comparación entre los niveles de PCBs y Longitud Recta de Caparazón (LRC).



#### 4.3.10. ESTUDIO ESTADÍSTICO

De los resultados obtenidos se analizaron 15 variables: tejidos, CB180, CB138, CB209, CB153, CB28,31, CB101, CB52, TOTAL PCBs (TOTPCB), DDE, DDD, DDT, TOTAL DDTs (TOTDDT), caquexia y longitud recta del caparazón (LRC). El amplio grado de variación observado en la concentración de organoclorados entre los ejemplares de tortugas estudiados, hizo que existan varianzas muy elevadas que no se comportan como una normal, lo que impidió llevar a cabo un análisis estadístico más significativo.

A partir del estudio de si existen o no diferencias significativas de detección de los diferentes compuestos analizados entre los dos tipos de tejidos estudiados, se observó, a partir del análisis de la T de Student, que existieron diferencias entre los

niveles contemplados en el tejido adiposo y hepático para los congéneres CB209, CB153, CB28,31 y para el total de PCBs con un nivel de significación de 0.10, es decir en un 90 % de los casos. Y para el congéneres CB52 con un 0.005 de significación. En todos los casos, salvo para el CB209, se asumieron varianzas iguales. Con ello se comprobó la mayor concentración para este grupo de organoclorados en el tejido hepático frente al adiposo. Los dos únicos congéneres que no se comportaron de la misma manera de modo significativo fueron el CB180 y el CB138, para los que no se apreciaron diferencias entre ambos tejidos. El grupo de DDTs no fue analizado por ser insuficientes el número de muestras para este tipo de análisis estadístico.

Según el estudio de correlaciones entre los diferentes organoclorados analizados, se estableció correlación entre todos de manera significativa, con la excepción de los congéneres 138 y 28-31 y en el caso de los congéneres 209, 153 y 101 entre sí. En el caso de los DDTs no existe un número suficientes de casos para considerar cualquier correlación entre ellos (Tabla 4.4).

Respecto al estudio relacionado con el factor caquexia, se adjudicaron valores de 0: para la ausencia de caquexia, 1: para la caquexia y 2: para casos de caquexia severa, y se establecieron para cada tortuga de acuerdo a los informes de necropsias respectivos.

Mediante la T-student se analizó si existía relación o no entre los niveles de los diferentes organoclorados y la presencia o no de caquexia. Los resultados no fueron significativos para ninguna de las variables analizadas por ser el número de tortugas que presentan caquexia insuficiente para realizar cualquier tipo de análisis estadístico. Sería necesario aumentar el número de muestras caquéticas para comprobar mediante la estadística si se confirma el patrón que se da al observar los casos analizados durante este estudio.

Los estudios estadísticos realizados sobre la LRC no demostraron ninguna relación entre ésta y el contenido de organoclorados para ambos tejidos.

**Tabla 4.4** Correlaciones entre los organoclorados analizados: DDE: o,p'-DDE; DDD: o,p'-DDD; DDT: o,p'-DDT; Sig: Significancia; Número muestral.

	PCB-180	PCB-138	PCB-209	PCB-153	PCB-28-31	PCB-101	PCB-52	DDE	DDD	DDT
PCB-180	1	,592(*)	,778(**)	,543(*)	,903(**)	,936(**)	,910(**)	(a)	-,070	,204
Sig. (bilateral)		,033	,008	,011	,000	,001	,000		,895	,742
N	31	13	10	21	18	8	19	1	6	5
PCB-138	,592(**)	1	1,000(**)	,987(**)	,424	,975(**)	1,000(**)	(a)	-,176	-1,000(**)
Sig. (bilateral)	,033		,000	,000	,295	,001	,000		,888	
N	13	14	4	10	8	6	9	1	3	2
PCB-209	,778(**)	1,000(**)	1	,536	,734(*)	,175	,844(**)	(a)	(a)	-1,000(**)
Sig. (bilateral)	,008	,000		,137	,024	,888	,001			
N	10	4	15	9	9	3	11	0	1	2
PCB-153	,543(*)	,987(**)	,536	1	,987(**)	,973(**)	,865(**)	(a)	,644	,815
Sig. (bilateral)	,011	,000	,137		,000	,000	,000		,167	,185
N	21	10	9	26	15	7	17	1	6	4
PCB-28-31	,903(**)	,424	,734(*)	,987(**)	1	,995(**)	,988(**)	(a)	-,728	-,070
Sig. (bilateral)	,000	,295	,024	,000		,000	,000		,272	,955
N	18	8	9	15	21	8	19	1	4	3
PCB-101	,936(**)	,975(**)	,175	,973(**)	,995(**)	1	,820(**)	(a)	-1,000(**)	(a)
Sig. (bilateral)	,001	,001	,888	,000	,000		,007			
N	8	6	3	7	8	10	9	1	2	1
PCB-52	,910(**)	1,000(**)	,844(**)	,865(**)	,988(**)	,820(**)	1	(a)	-,860	,011
Sig. (bilateral)	,000	,000	,001	,000	,000	,007			,341	,993
N	19	9	11	17	19	9	21	1	3	3
DDE	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	1	-,995	(a)
Sig. (bilateral)									,061	
N	1	1	0	1	1	1	1	3	3	0
DDD	-,070	-,176	(a)	,644	-,728	-1,000(**)	-,860	-,995	1	1,000(**)
Sig. (bilateral)	,895	,888		,167	,272		,341	,061		,001
N	6	3	1	6	4	2	3	3	10	3
DDT	,204	-1,000(**)	-1,000(**)	,815	-,070	(a)	,011	(a)	1,000(**)	1
Sig. (bilateral)	,742			,185	,955		,993		,001	
N	5	2	2	4	3	1	3	0	3	9

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

a No se puede calcular porque al menos una variable es constante.

#### 4.3.11 DETECCIÓN DE ORGANOCLORADOS EN MUESTRAS DE SANGRE

Si bien el número de muestras sanguíneas analizadas resultó insuficiente para ser significativo, los niveles detectados en sangre fueron inferiores a los detectados en los tejidos adiposo y hepático. Los resultados de las muestras coincidentes se muestran en la Tabla 4.5 conjuntamente a los obtenidos en los tejidos adiposo y hepático para su comparación, junto a los resultados de las restantes muestras sanguíneas analizadas.

**Tabla 4.5** Niveles de los congéneres 138, 153 y 180 en muestras de sangre de tortugas marina y de tejido adiposo y hepático de las tortugas coincidentes ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso húmedo).

TORTUGAS	MUESTRAS	PCB 138	PCB 153	PCB 180
I-77/03	SANGRE	0.56	0.73	1.38
	GRASA	69.45	90.20	99.03
	HÍGADO	88.73	0	111.16
I-82/03	SANGRE	0	0	0.01
	GRASA	0	0	0
	HÍGADO	0	0	2665
I-271/03	SANGRE	0.41	0.55	0.13
	GRASA	0	0	0
	HÍGADO	0	49.93	66.03
I-323/02	SANGRE	0.17	0.13	0.02
I-337/02	SANGRE	0.77	0.41	0.18
I-493/02	SANGRE	0.40	0.62	0.09
I-224/03	SANGRE	0.08	0.07	0.02
I-541/03	SANGRE	0	0	0
I-768/03	SANGRE	0.15	0.05	0.03
I-112/04	SANGRE	0.09	0.13	0.02
I-460/04	SANGRE	0.09	0.11	0.01

#### 4.3.12 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

Si bien los resultados derivados de los diferentes ensayos realizados sobre la SPME en muestras de tejido animal no resultaron satisfactorios según el patrón de referencia certificado CARP-2 (National Research Council Canada), sí nos han orientado en los primeros pasos a considerar en el estudio de esta metodología.

Del ensayo número 1, no se detectaron niveles de organoclorados en ninguna de las pruebas realizadas, lo que nos llevó a realizar el ensayo número 2. A partir de éste pudimos concluir que los resultados mejoran cuando las muestras se recuperan a partir de agua mili-Q en lugar de hexano o cualquier otro disolvente orgánico, así como las mejores condiciones para la fase de absorción. Dentro del estudio realizado, los mejores resultados se obtienen en ausencia de sales, con agitación magnética y con un tiempo de absorción de 45 minutos. Los resultados se muestran en la tabla 4.6 a continuación.

**Tabla 4.6** Resultados, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . de peso húmedo, de los niveles de PCBs detectados a partir de los diferentes ensayos

Ensayos	180	138	209	153	28,31	101	52
Hexano + PCBs 45 min. + agitación	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
Mili-Q + PCBs 45 min. + agitación	6625912	2914921	4593260	4823636	2004060	1727378	250716
Mili-Q + PCBs 90 min.	5331607	1987865	2413543	3223951	951983	817881	242368
Mili-Q + PCBs 45 min.	5215372	2907744	3186457	4057976	2385090	1099763	245837

A partir del ensayo 3, comenzamos a detectar niveles de organoclorados pero los resultados aun no se incluían en el rango fijado por el patrón de tejido certificado (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7** Resultados obtenidos, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . de peso húmedo, según ensayo número 3 y comparación con el patrón de referencia CARP-2 (National Research Council Canada). nd: no detectado.

CONGÉNERES DE PCB	RESULTADO	CARP-2
52	$26.54 \pm 9.4$	$138 \pm 43$
153	$11.63 \pm 4,3$	$105 \pm 22$
180	$3.1 \pm 1.23$	$53.3 \pm 13$
28	nd	$34 \pm 7.2$

De los resultados obtenidos a partir del ensayo 4, concluimos que las muestras cuya extracción de grasa se realizó mediante Soxhlet se aproximaron más a los resultados esperados según los obtenidos por el método seguido según TANABE *et al.*



(1994), que aquellas procesadas sin el uso de Soxhlet. Aun así, los niveles resultaron muy dispares a los esperados, no pudiendo concluir si existen diferencias o no respecto al tejido procesado o al tipo de congénere de PCB detectado (Tabla 4.8). Se hace necesario un estudio que abarque un mayor número de muestras y que permita obtener nuevas conclusiones respecto a las variables que inciden en la metodología.

**Tabla 4.8** Resultados, en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . de peso húmedo, del ensayo 4 según la metodología descrita por Tanabe *et al.* (1994), SPME, SPME con uso de Soxhlet, SPME con adición de patrón PCB a la muestra. nd: no detectado.

TORTUGAS	TEJIDO	MÉTODO	180	138	209	153	28,31	101	52
I-77/03	GRASA	Tanabe et al.	99.03	69.45	nd	90.20	38.22	14.84	37.87
		SPME	nd	nd	nd	3.52	nd	nd	7.91
		SPME+SOXH	74.27	52.09	nd	67.75	28.66	11.13	28.40
		SPME+PCBs	14998,4	6316,8	8381	14609,9	6069,5	3726,2	4405,7
	HÍGADO	Tanabe et al.	111.16	88.72	nd	nd	nd	nd	nd
		SPME	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		SPME+SOXH	83.37	66.55	nd	nd	nd	nd	nd
		SPME+PCBs	19391.9	5421	4501.5	7.652.9	7334.1	9102	8561.6
I-265/03	GRASA	Tanabe et al.	90.06	49.48	nd	69.51	5.70	64.26	7.80
		SPME	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		SPME+SOXH	81.06	34.53	nd	50.43	nd	32.14	nd
		SPME+PCBs	12549.4	6782.9	6710.5	6784.7	5438.7	6593.2	6108.8
	HÍGADO	Tanabe et al.	nd	nd	207.59	nd	3.37	15.24	8.39
		SPME	nd	nd	13.08	nd	nd	nd	nd
		SPME+SOXH	nd	nd	171.27	nd	nd	7.38	nd
		SPME+PCBs	4829.3	3847.2	23057.6	6850.2	7642.3	7966.6	7455.3
I-128/04	GRASA	Tanabe et al.	nd	nd	551.53	55.80	9.65	nd	11.35
		SPME	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		SPME+SOXH	nd	nd	401.92	nd	nd	nd	nd
		SPME+PCBs	5743.9	4053.6	19320	6971.9	7351.8	7694.6	5483.9
	HÍGADO	Tanabe et al.	113.92	nd	526.28	251.42	71.46	nd	8.66
		SPME	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		SPME+SOXH	93.99	nd	234.18	207.42	nd	nd	3.75
		SPME+PCBs	17698.7	4351.8	20763.4	18674.9	7840	8632.7	7690.1



ZOOSSOON



## 5. DISCUSIÓN

El estudio anatomopatológico determinó que el 71.87 % (23/32) de las tortugas necropsiadas resultaron muertas por causas directamente relacionadas con la actividad humana: ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca (37.5 %, 12/32), enmallamientos (21.87 %, 7/32) y traumatismos contra embarcaciones (12.5 %, 4/32). El resto de los ejemplares (28.13 %, 9/32) murieron debido a diferentes patologías, entre las que destacan septicemias bacterianas, enfisema pulmonar, queratoconjuntivitis purulenta, adenitis purulentas de las glándulas excretoras de sal y lesiones en cloaca e intestino entre otras.

En el estudio realizado por ORÓS *et al.* (2004b) en el que se analizaron 136 tortugas marinas varadas en Canarias durante el período 1993-2001 se evidenciaron lesiones digestivas en 84 tortugas, presentando 33 de estas tortugas lesiones digestivas derivadas de la interacción humana asociadas con la ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca, y 2 ejemplares lesiones digestivas asociadas con la ingestión de crudo. Los autores describieron como principales lesiones esofágicas las esofagitis ulcerativas y fibrinosas y las perforaciones de esófago principalmente asociadas con la ingestión de anzuelos. También es destacable en dicho estudio que todos los casos de enteritis necrótica estuvieron

asociados con intususcepciones intestinales causadas por la ingestión de monofilamentos de pesca.

Otro estudio también llevado a cabo en las Islas Canarias por ORÓS *et al.* (2005) sobre las patologías y causas de mortalidad de 93 tortugas marinas varadas durante el período 1998-2001 evidenció que el 69.89 % de las tortugas murieron debido a lesiones asociadas con la actividad humana, tal como traumatismos con embarcaciones (23.66 %), enmallamiento en redes de pesca (24.73 %), ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca (19.35 %), e ingestión de crudo (2.15 %). Tan sólo el 26 % de las tortugas murieron debido a enfermedades espontáneas que incluyeron diferentes tipos de neumonía, hepatitis, meningitis, procesos septicémicos y neoplasias.

En nuestro estudio la muerte como consecuencia de las lesiones originadas por la ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca se presentó en el 37.5 % (12/32) de las tortugas necropsiadas y se relacionó con lesiones multisistémicas consecutivas a procesos septicémicos o con lesiones entéricas asociadas a la ingestión de monofilamentos.

Los casos de enmallamiento como posible causa de muerte ascendieron al 21.87 % de los ejemplares necropsiados (7/32). La muerte se produce en la mayoría de los casos como consecuencia de la septicemia originada a partir de las lesiones lineales necróticas de las extremidades afectadas. En la memoria de actividades realizadas en el CRFST durante 1998 se indica que el 56 % (45/72) de las tortugas ingresadas lo hicieron con una historia clínica de enmallamiento (CALABUIG, 1998). Un estudio comparativo entre nuestros datos y los de dicha memoria de actividades permite inducir que se alcanzó un mayor porcentaje de éxito en la recuperación de animales enmallados que en las tortugas con ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca dada la afectación de intestino (intususcepción intestinal, enteritis necróticas y perforaciones del tracto intestinal). También en el caso de los traumatismos los porcentajes de éxito en la recuperación son inferiores dada la afectación de órganos vitales como pulmón y riñones en contacto estrecho con amplias áreas del caparazón.

El enmallamiento en redes o la ingestión de anzuelos de los palangres se describe como la causa principal de mortalidad debida a la actividad humana. Así, entre 1983 y 1991 fueron capturadas más de 3000 tortugas en aguas internacionales al Norte de Canarias (BLANCO & GONZÁLEZ, 1992; LÓPEZ-JURADO & GONZÁLEZ, 1983). Aunque la mayor parte

de los animales son devueltos al mar, se estima que el 15-50 % de las tortugas capturadas mueren como consecuencia de las lesiones inducidas por los anzuelos (LIZANA & BARBADILLO, 1997).

En nuestro estudio el porcentaje de tortugas en las que se observaron severas lesiones de origen traumático que condujeron a su muerte ascendió al 12.5 % (4/32). En el Golfo de México durante 1986-1993 se estimó que los traumatismos por embarcaciones estuvieron involucrados en el 9 % de los varamientos (SCHROEDER, 1987; TEAS, 1994). En Florida la incidencia se estimó en un 18 % sobre un total de 2156 varamientos entre 1991-1993 (GEORGE, 1997). Sin duda la presión pesquera en las aguas de las Islas Canarias, así como el elevado número de embarcaciones de recreo, contribuyen a estos resultados.

En el estudio toxicológico de detección de organoclorados en tortugas marinas varadas en las Islas Canarias se detectaron mayores niveles de compuestos clorados en hígado que en grasa.

En las referencias bibliográficas consultadas los niveles de organoclorados en el tejido adiposo resultan ser superiores al resto de los tejidos analizados, salvo en el estudio realizado por GARDNER *et al.* (2003), en el que los niveles detectados en el hígado de una tortuga boba y una tortuga olivácea superaron los niveles del tejido adiposo. Según la bibliografía, el orden de mayor a menor concentración de organoclorados detectados en tortugas marinas, como en otras especies de mamíferos marinos y resto de especies estudiadas, es el siguiente: grasa subcutánea, hígado, riñón, y músculo (TANABE *et al.*, 1983; MARTINEU *et al.*, 1987; COLBORN & CLEMENT, 1992; RYBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1999). Esta mayor concentración de contaminantes lipofílicos en el tejido adiposo responde al mayor porcentaje de triglicéridos que existe en la grasa subcutánea frente al resto del organismo y la mayor afinidad de los organoclorados por este tipo de lípidos (COCKROFT *et al.*, 1989).

Si bien este hecho debería resultar en nuestro estudio en una mayor concentración de organoclorados en las muestras de grasa que en hígado, se debe considerar el estado de las tortugas en el momento de la necropsia. La gran mayoría de las tortugas analizadas fueron remitidas muertas o eutanasiadas después de un largo período de enfermedad en el que la inanición dio lugar a un cuadro de caquexia en un número importante de los

ejemplares. Algunas de las tortugas necropsiadas también mostraron un ligero grado de autólisis en el momento de la necropsia, lo que pudo originar un mayor porcentaje de ácidos grasos libres, productos de la hidrólisis de lípidos saponificables, en los tejidos analizados (CHRISTIE, 1982).

Aunque el grado de autólisis en algunas de las tortugas no resultó limitante para la extracción de muestras por no figurar entre los objetivos del estudio la determinación del tipo de composición lipídica de los tejidos, el estado de caquexia y septicemia de algunos ejemplares resultó fundamental en los resultados obtenidos.

Del total de las 26 tortugas con detección de organoclorados para ambos tejidos, 15 presentaron niveles más elevados en hígado que en grasa. Un estudio detallado de los ejemplares con mayor contenido de organoclorados en el tejido hepático nos muestra que en todos los casos, los ejemplares se caracterizan por padecer septicemia o caquexia. Nueve de las once tortugas diagnosticadas de septicemia presentaron niveles de organoclorados más elevados en hígado que en grasa. En la bibliografía citada para las tortugas marinas, varios son los estudios que concluyen con una alteración del sistema inmune en ejemplares cuyos organismos presentan algún contenido en organoclorados, (RYBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1999; ALAM & BRIM, 2000; KELLER *et al.*, 2004).

De la misma manera, estudios sobre mamíferos marinos, convertidos en el objetivo principal de los estudios realizados sobre organoclorados en animales acuáticos debido a su posición en el más alto nivel de la cadena trófica, establecieron cómo en momento de cambios fisiológicos como enfermedades, temperaturas extremas, compromiso nutricional o gestación y lactancia, los organoclorados pueden ser metabolizados y repartidos por el organismo mediante la circulación sanguínea ocasionando de esta manera mayores efectos tóxicos en el organismo (MATTHEWS *et al.*, 1984; HUMPHREY, 1988; AGUILAR & BORRELL, 1994b). Las muertes masivas de focas en el Mar Báltico y Mar del Norte (DIETZ *et al.*, 1989), de delfines a lo largo de la costa Este de los Estados Unidos (GERACT, 1989), y de delfines *Stenella coeruleoalba* en el Mar Mediterráneo (DOMINGO *et al.*, 1992; AGUILAR & RAGA, 1993; KANNAN *et al.*, 1993c; AGUILAR & BORRELL 1994b; AZNAR *et al.*, 1994; FORCARDA *et al.*, 1994) han provocado la hipótesis que los contaminantes químicos sintéticos podrían estar implicados en estos sucesos mediante la reducción de las competencias del sistema inmune de los animales, incrementando así, su vulnerabilidad a

las infecciones (SIMMONDS, 1992; 1994). Por otro lado, las cantidades de contaminantes atrapados en las reservas lipídicas pueden llegar a ser una fuente adicional de estresantes cuando son liberados a la circulación sanguínea de un animal infectado durante su lucha contra los virus o bacterias (SIMMONDS, 1994).

Todo lo expuesto anteriormente nos induce a pensar que la presencia de los organoclorados en las tortugas marinas analizadas resulta en una mayor vulnerabilidad de los animales ante cualquier agente causante de infección y posterior septicemia. La razón de por qué se dan niveles más elevados en hígado que en grasa en estos ejemplares, justificaría la previa movilización de las reservas adiposas del animal y la consecuente liberación de los organoclorados almacenados previamente en dicho tejido. Esta movilización y su mayor disposición para el resto de los tejidos desembocaría, como ya citaran BERNHOFT & SKAARE (1994), en una mayor o más clara evidencia del efecto de los organoclorados en el organismo, creando entre otras ya mencionadas, la depresión del sistema inmunológico y por tanto la mayor predisposición del organismo a padecer cualquier tipo de enfermedad o infección que desemboquen en los cuadros de septicemias observados para este grupo de tortugas. Diversos estudios establecen que los animales con mayor porcentaje de grasa acumulan y toleran mayores concentraciones de químicos tóxicos debido al almacenamiento de éstos en las reservas lipídicas y, por tanto, la menor disposición de los mismos en el resto de los tejidos. Este hecho mitiga los efectos de los contaminantes sobre el organismo, quedando el animal protegido durante el tiempo que permanecen inmovilizados en las reservas grasas. Por el contrario, los animales que precisan de la utilización de las reservas lipídicas para la obtención de energía movilizan los residuos alojados en el tejido adiposo, lo que conlleva a un mayor nivel de organoclorados en el resto de los tejidos y la mayor exposición del organismo a sus efectos.

Lo anteriormente expuesto justificaría también la otra característica a destacar entre los ejemplares con mayores niveles de organoclorados en el tejido hepático, la presencia de caquexia. En el estudio llevado a cabo por AGUILAR *et al.* (1999) en mamíferos marinos se establece cómo las variaciones nutritivas en ejemplares de una misma población pueden dar a lugar a diferencias en el contenido lipídico de los tejidos, tanto en volumen como en composición, alterando con ello el contenido de organoclorados que albergan. Basándose en lo anterior, BERNHOFT & SKAARE (1994) establecen que existe una mayor posibilidad de

detectar en animales caquéuticos una mayor concentración de compuestos organoclorados de alto peso molecular, menos accesibles en otros casos, en el resto de los tejidos.

Aunque no podamos contar con un número suficiente de muestra que resulte representativo, sí que es posible observar cómo en cuatro de las siete tortugas diagnosticadas de caquexia, la concentración de organoclorados en hígado resultó mayor que en el tejido adiposo del animal. Ello podría deberse por la necesidad del organismo de recurrir a las reservas lipídicas para la obtención de energía en los momentos de inanición y la consecuente movilización de los compuestos organoclorados por el resto del organismo y el hígado como alternativa ante su elevado contenido en grasa y su destacada función desintoxicante (BERNHOF & SKAARE, 1994).

Las tres tortugas restantes diagnosticadas de caquexia y cuyo contenido de organoclorados en grasa superó al detectado en el tejido hepático presentaron diferentes alteraciones en el hígado que podrían variar las características que lo convierten en un adecuado receptor de los organoclorados liberados de las reservas lipídicas del animal. Por otro lado, según estudios realizados por AGUILAR (1987) se ha comprobado cómo la movilización de los lípidos resulta en un aumento de los niveles tóxicos en el resto del organismo, aunque la variación no es tan alta como se pudiera esperar, ya que en ocasiones los contaminantes permanecen en el tejido. La razón de esta acumulación intermedia no está clara, pero parece ser que cuando la concentración tisular de contaminantes aumenta, la capacidad de excreción atenúa el aumento producido por la movilización de los lípidos. Esto podría explicar que algunos de los ejemplares diagnosticados de caquexia mantengan aún elevados niveles de organoclorados en grasa.

Entre el resto de los tejidos del organismo, resulta razonable pensar que sea el hígado el que acumule los mayores niveles de sustancias organocloradas, tanto por su alto contenido en grasas, como por ser el principal órgano de metabolización de las sustancias tóxicas para el organismo. En un estudio sobre los niveles de organoclorados en peces, se estableció que la exposición de peces a los PCBs puede no alterar la composición lipídica de éstos, pero puede incrementar los niveles de peroxidación de lípidos y alterar la deposición en el hígado (NIMMO *et al.*, 1975; WOFFORD & THOMAS, 1988). Además de estas dos razones, debemos considerar la importancia específica del hígado bilobular de las tortugas marinas en la masa corporal de las mismas. Como publicara AGUILAR (1985), un

órgano contribuirá de manera más importante a la carga total de contaminantes cuanto mayor sea su contenido en grasa o cuanto mayor sea su representación en la masa corporal del organismo. Según esto, sería más probable detectar elevados niveles de organoclorados en el hígado de las tortugas marinas que en otras especies en las que, como en el caso de los mamíferos marinos, el hígado no alcance la misma importancia en la representación de su masa corporal.

Hay que destacar que los valores más elevados registrados en el contenido de organoclorados para el total de las tortugas analizadas se dan en el tejido hepático, alcanzando un valor máximo de 15438.71 ppb. Siete son los casos que destacan por sus altos niveles (superiores a 900 ppb) respecto a la bibliografía consultada, de los cuales, cuatro presentan un claro cuadro de septicemia y los otros tres restantes de caquexia, lo que nos refuerza a considerar las hipótesis anteriormente establecidas.

El estudio de GARNER *et al.* (2003) que coincide con alguno de los resultados obtenidos en nuestro estudio, no aporta información sobre el estado general de las tortugas, por lo que no es posible concluir a partir de él, una relación entre la distribución de la mayor concentración de organoclorados en el tejido hepático y la existencia de un cuadro de caquexia o septicemia en los ejemplares analizados. Sería necesario por tanto un estudio más amplio en cuanto a variedad de tejidos analizados y las condiciones generales de las tortugas en el momento de la necropsia.

El principal grupo de organoclorados detectados en este estudio, al igual que en la bibliografía consultada para tortugas y mamíferos marinos fue el de los PCBs. Los DDTs, aunque alcanzaron un nivel importante de 798.80 ppb en hígado para el caso del DDD, y un valor de 810.85 ppb para el total de DDTs, no se detectaron en un número significativo de las muestras. El grupo de los DDTs analizado fue el grupo 2,4'-DDTs. Este tipo de organoclorados no es detectado comúnmente en muestras biológicas, dándose en muy pocos casos y a bajas concentraciones (RYBITSKI *et al.*, 1995). El más frecuente y de mayor nivel fue el 2,4'-DDD, un componente del pesticida clordano ampliamente utilizado. Los mayores niveles se detectaron en el hígado, con un rango que osciló desde no detectado (nd) hasta los 798.80 ppb, mientras que en el tejido adiposo alcanzó su valor máximo en 121.79 ppb. En el caso del 2,4'-DDT presentó sus mayores niveles en grasa, en un rango que osciló desde nd hasta 327.23 ppb, siendo inferior en el hígado. Esta preferencia de los

compuestos por uno u otro tejido parece responder al hecho de que tanto el DDD como el DDE son resultado de la metabolización del DDT, lo que justifica que sean más frecuentes en el tejido encargado de la metabolización de los compuestos, el hígado. Así, mientras el DDT permanezca alojado en las reservas lipídicas, seguirá manteniendo su composición y no descenderán sus niveles a favor de sus metabolitos, registrando los mayores niveles en el análisis de la grasa subcutánea. Mientras que el hígado registrará niveles inferiores de DDT respecto al tejido adiposo como consecuencia de aumentar los niveles de sus metabolitos, principalmente del DDD. El 2,4'-DDE no se detectó en ninguna muestra de grasa y en las pocas que se encontró en hígado, no superó los 26.24 ppb. La no detección de este compuesto se refleja en la bibliografía y se justifica por la mayor resistencia de su antecesor, el 2,4'-DDD, a la metabolización, lo que conlleva a la acumulación de los niveles de DDD, según se lleva a cabo la metabolización del DDT (RYBITSKI *et al.*, 1995; GARDNER *et al.*, 2003). Son pocos los estudios que analizan el contenido del 2,4'-DDT y sus metabolitos en tortugas marinas y otras especies acuáticas, la mayoría de los trabajos se basan en el 4,4'-DDT y sus isómeros. Estudios en tortugas concluyen que el 4,4'-DDE con un valor máximo publicado de 1210 ppb, representa la mayor concentración en el total de las muestras, más de un 95 % respecto al 4,4'-DDT y 4,4'-DDD (RIBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.* 1999). El orden según la concentración hallada de los componentes del 4,4'-DDT al contrario de lo que muestra nuestro estudio para el 2,4'-DDT y sus metabolitos, es 4,4'-DDE > 4,4'-DDT > 4,4'-DDD (MCKENZIE *et al.* 1999). En todos los casos las mayores concentraciones detectadas se localizaron en el tejido adiposo (RIBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.* 1999). En el caso de los mamíferos marinos, los odontocetos presentan las mayores concentraciones del total de DDTs publicadas para cualquier especie de vida libre. La mayor detectada para el sumatorio de DDTs alcanza 225 ppm para una beluga muerta del noroeste de Canadá con una media de 58 ppm para la misma población (MARTINEAU *et al.*, 1987). Las concentraciones varían dentro de las distintas especies de mamíferos marinos y según las áreas geográficas a las que se refieran, pero siempre con elevadas proporciones respecto a otras especies situadas en un nivel trófico inferior. La proporción de DDT y sus metabolitos no se refleja de una manera evidente como en el caso de las tortugas marinas, variando entre las diferentes especies y las distintas áreas geográficas (COLBORN & SMOLEN, 1996).



Los niveles de PCBs encontrados en las tortugas marinas varadas en las Islas Canarias oscilaron desde no detectados hasta 9649.267 ppb en el tejido adiposo y desde no detectados hasta 40783.455 ppb en el tejido hepático. Los resultados superan de manera importante los rangos detectados por otros autores en tortugas de la misma especie: un rango de 55-1730 ppb en tejido adiposo, 8.3-514 ppb en hígado, < 2 ppb en músculo y 4.8 ppb en riñón de tortugas bobas en Virginia (USA) (RYBITSKI *et al.*, 1995), un rango de 775-893 ppb en tejido adiposo y de 50-159 ppb en tejido hepático de tortugas bobas en Grecia (MCKENZIE *et al.* 1999), y un rango de 5-133 ppb en el tejido hepático y 8 ppb en músculo de tortugas en Florida (MCKIM & JOHNSTON, 1983). Estos rangos mencionados fueron superiores a los hallados en tortuga verde y tortuga laúd (MCKENZIE *et al.*, 1999; MCKIM & JOHNSTON, 1983; GODLEY *et al.*, 1998). Los mayores niveles detectados según la bibliografía consultada se encontraron en tortugas bobas del norte de Carolina en rangos de 55-1730 ppb en tejido adiposo y de 8.3-514 ppb en tejido hepático (RYBITSKI *et al.*, 1995). La diferencia respecto a los datos obtenidos en nuestro estudio es bastante significativa, superando en nuestro caso los límites de 2 ppm determinados por la Food and Drug Administration (FDA). Aun así, los niveles detectados resultaron inferiores a los observados en odontocetos, entre los que se alcanzan valores de 576 ppm en belugas del estuario de St. Lawrence (MARTINEAU *et al.*, 1987) o 393 ppm en delfines del Mediterráneo (KANNAN *et al.*, 1993c).

En nuestro estudio se citan seis ejemplares con niveles superiores a 2 ppm y siete tortugas con niveles superiores a 900 ppb, todas caracterizadas por padecer septicemia o presentar un importante cuadro de caquexia. El resto de las muestras osciló en rangos más similares al resto de estudios publicados, entre nd a 704.859 ppb en grasa y entre nd a 971.755 ppb en hígado, manteniendo un mayor nivel de organoclorados en el tejido hepático. El estado precario del organismo en estos siete ejemplares podría ser la causa de llevar una carga anormal de contaminantes, lo que hace cuestionable que la concentración en los tejidos de estos ejemplares sea representativo o no de las condiciones normales como publicaran AGUILAR *et al.* (1999). La existencia de una relación causa-efecto entre la susceptibilidad a la enfermedad y los niveles altos de organoclorados ha sido una sustancial controversia que aún hoy sigue sin ser aclarada (KENNEDY, 1999). El motivo de tan altos valores y la pauta que comparten estos siete ejemplares puede deberse a una interacción

entre el estado precario del organismo que, como hemos mencionado, lo dejara más vulnerable a los efectos adversos de estos contaminantes y la exposición a fuentes importantes de organoclorados. Que el resto de las tortugas con un cuadro similar de caquexia no presenten niveles tan elevados indica que la concentración de organoclorados a la que se vieron expuestas debió ser inferior a la de los casos previamente mencionados.

El alto grado de variación detectado en los niveles de organoclorados entre los ejemplares de las tortugas estudiadas se puede atribuir a diferentes causas. Cuando se estudia un número lo suficientemente amplio de ejemplares pertenecientes a la misma población se observa una variación sustancial en los niveles de residuos detectados. Ello sugiere que aun expuestas a las mismas condiciones ecológicas, la exposición y la capacidad de excreción de las tortugas es también diferente. El nivel de los organoclorados en el tejido animal se ve afectado por la exposición a diferentes fuentes de contaminantes y la condición del animal (O'SHEA & BROWNELL, 1994; RYBITSKI *et al.*, 1995). Asimismo, el sexo, la edad, la talla y composición corporal, la condición nutritiva, la incidencia de enfermedades y el estado reproductivo del animal tienen una importancia significativa en los niveles acumulados por el organismo (MARTINEAU *et al.*, 1987). Si bien la mayoría de las tortugas de nuestro estudio fueron hembras en etapas juveniles pelágicas y juveniles, varió de manera importante su estado sanitario, observándose desde ejemplares con un aparente buen estado de salud previo (ej. las muertas por causas traumáticas) hasta las que cursaron con largos períodos de inanición y enfermedad con resultados visibles en el organismo.

La exposición de la tortuga a diferentes compuestos químicos puede variar con la ruta de migración seguida. Aunque algunas especies pueden congregarse en las zonas de alimentación cercanas a las playas de anidamiento, no existen evidencias sobre migraciones en grupo en el caso de las tortugas marinas (RYBITSKI *et al.*, 1995). Durante la migración, que puede abarcar decenas de miles de kilómetros (ZISWILER, 1986), las tortugas frecuentan diferentes áreas con distintos grados de contaminación, lo que supone una diferencia en la exposición de contaminantes para cada ejemplar. Además de esta diferencia en el grado de contaminación de las áreas que frecuentan y por tanto en las que se alimentan, influye también el tipo de dieta consumida por la tortuga. MCKENZIE *et al.* (1999) estudiaron la diferencia entre los niveles de organoclorados en tres especies de tortugas: tortuga boba

(hábitos omnívoros), tortuga verde (hábitos herbívoros), y tortuga laúd (que se alimenta principalmente a base de medusas y otros organismos pelágicos). Los niveles detectados fueron mayores en las tortugas bobas que en las tortugas verdes de las mismas áreas del Mediterráneo, justificándose por el diferente tipo de dieta de cada especie. En el caso de las tortugas laúd los niveles resultaron similares a los encontrados en las tortugas verdes, si bien éstas no compartían los mismos hábitats. La importancia del tipo de dieta y la diferente exposición a los contaminantes quedó también reflejada en el estudio llevado a cabo por GODLEY *et al.* (1998) entre tortugas bobas y laúd de la costa oeste de Gran Bretaña. Los bajos niveles detectados en tortuga laúd se justifican por sus hábitos pelágicos (detéctándose niveles inferiores de organoclorados respecto a las zonas neríticas), y dietéticos (siendo la base fundamental de su dieta organismos que ocupan los primeros niveles en la cadena trófica marina, no dándose en éstos un importante grado de biomagnificación).

Las tortugas varadas en nuestras costas comparten una misma ruta de migración desde las zonas de cría del Atlántico Occidental, pasando por el Mar de los Sargazos, hasta nuestras costas a través de la corriente del Golfo (PÉREZ-JIMÉNEZ, 1997). Recientemente el descubrimiento de áreas de puesta en el archipiélago de Cabo Verde ha impulsado estudios que demuestran que algunos de los ejemplares juveniles avistados en aguas de las Islas Canarias proceden de Cabo Verde (Dellinger, 2006). Por otra parte, aun frecuentando los mismos hábitats y por tanto los mismos focos de contaminación, las presas de las que se alimentan presentan distintos niveles de organoclorados condicionando finalmente, junto al estado general del organismo, la concentración final detectada en cada ejemplar. En nuestro estudio no se comparan las concentraciones detectadas en diferentes especies de tortugas por no contar con un número representativo de tortugas de diferentes especies.

Los congéneres de PCBs más frecuentes se repitieron en la casi totalidad de las tortugas analizadas. Los grupos más destacados por su frecuencia de detección y por los niveles alcanzados fueron los hexa y heptaclorados, entre los que se encuentran los congéneres 180, 153 y 138. Éstos figuran entre los más citados en los diferentes estudios sobre organoclorados en tortugas marinas y mamíferos marinos (MUIR *et al.*, 1988; GAGNON & DODSON, 1990; LAKE *et al.*, 1994; RYBITSKI *et al.*, 1995; COLBORN & SMOLEN, 1996; ALAM & BRIM, 2000; STORELLI & MARCOTRIGIANO, 2000). Su alta predominancia

en la mayoría de los estudios responde a la alta proporción en la que se encuentran en las fórmulas industriales y su resistencia a ser metabolizados por no tener átomos de hidrógenos vecinales. Fueron categorizados por SAFE (1990) como congéneres de baja toxicidad por poseer al menos dos átomos de cloro en posición orto, pero adquieren una gran importancia en cuanto a su potencial toxicidad y su alta prevalencia en los ecosistemas (MCFARLAND & CLARKE, 1989). El congénere 138, si bien no se presentó con tanta frecuencia en las muestras como el resto de los mencionados, resultó ser de los más importantes por los altos niveles alcanzados, y se identifica como uno de los principales causantes de efectos biológicos adversos por su actuación sobre el sistema de la oxigenasa de función mixta (RYBITSKI *et al.*, 1995). Los mayores niveles detectados para los congéneres citados fueron 13299.336 ppb para el congénere 138, 15438.71 para el 153 y 5006.162 para el 180. Los resultados superan de manera importante otros estudios de tortugas marinas, en los que se registran niveles de 169 ppb para el congénere 138, 261 ppb para el 153 y 154 para el 180 (MCKENZIE *et al.*, 1999). En el caso de los mamíferos marinos se registran valores muy superiores en delfines listados, alcanzando 60000 ppb para el 138, 73000 ppb para el 153 y 39000 ppb para el 180 (COLBORN & SMOLEN, 1996). Aun mostrando diferentes resultados, tanto en lo observado en las tortugas marinas de nuestro estudio, como en tortugas de otros trabajos y en los realizados en mamíferos marinos, podemos apreciar cómo en los tres casos se mantienen el mismo orden entre los congéneres citados según los niveles detectados,  $153 > 138 > 180$ .

La totalidad de los congéneres de PCBs estudiados, salvo el 209, se detectaron con una mayor frecuencia en el tejido adiposo. En la mayoría de los casos en los que se detectaron en ambos tejidos, los mayores niveles alcanzados (excepto en el caso del congénere 180) se observaron en el tejido hepático. Destacó en nuestro estudio el congénere 209, perteneciente al grupo de los decaclorobifenilos, por su alta frecuencia y elevados niveles alcanzados en el hígado, llegando a alcanzar un valor máximo de 14877.485 ppb. En el tejido adiposo, aunque también alcanzó niveles importantes, no se detectaron concentraciones tan elevadas como las detectadas en el hígado, y su frecuencia de detección fue igualmente bastante inferior. Ello podría indicar que la acumulación del tipo de congéneres en el hígado pudiera estar correlacionada con el aumento en el número de átomos de cloro. La diferencia observada entre los congéneres 138 y 153, ambos con un

mismo número de átomos de cloro, podría deberse a la diferencia estructural que existe entre ellos (la mayor simetría que presenta la molécula del congénere 153).

La tendencia del hígado a acumular congéneres de PCBs con mayor número de átomos de cloro se podría interpretar como el resultado de la mayor dificultad que aparece a la hora de metabolizar tales congéneres. El congénere 209 presentó en el hígado sus mayores niveles en los siete casos destacados anteriormente y en la mayoría de los casos en los que aparece, salvo en dos, resultó el congénere de mayor nivel detectado. Salvo en el estudio realizado por GARDNER *et al.* (2003) en el que se detectó este congénere a muy bajo nivel en el tejido adiposo, hepático y muscular, mostrando este último la mayor concentración seguido del hígado y de la grasa, no se destaca este congénere en el resto de la bibliografía consultada.

Otros congéneres detectados con frecuencia fueron los pertenecientes a los grupos de los tri y tetraclorobifenilos, el 28, 31 y el 52, aunque sus niveles no resultaron importantes respecto al resto de los congéneres detectados, de acuerdo con otros estudios publicados (RYBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1999; ALAM & BRIM, 2000; STORELLI & MARCOTRIGIANO, 2000). También para estos congéneres los mayores niveles detectados fueron en el tejido hepático, aun siendo detectados con menor frecuencia que en el tejido adiposo.

Resulta difícil determinar el impacto de los compuestos organoclorados sobre el estado sanitario de las tortugas analizadas. El 71.87 % de las tortugas estudiadas resultaron muertas por causas directas relacionadas con la actividad humana (ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca, enmallamientos y traumatismos contra embarcaciones). Además es poco probable que los niveles de organoclorados detectados puedan provocar efectos agudos visibles sobre el organismo, siendo los efectos crónicos mucho más difíciles de verificar.

Pocos estudios han analizado los efectos de los organoclorados en las tortugas marinas o en otros reptiles, y no se han establecido los niveles de organoclorados capaces de causar patologías en las tortugas marinas. En 25 de las tortugas analizadas se detectaron niveles de organoclorados en el tejido hepático, llegando incluso a los niveles mencionados de 15438.71 ppb. Salvo en cinco casos, no correspondientes al nivel mencionado ni a los más alto niveles detectados, ninguna tortuga presentó lesión alguna en el hígado, por lo que

se sugiere que niveles de organoclorados inferiores a los detectados en nuestro estudio no producen ninguna lesión hepática aguda evidente. Los casos de tortugas que mostraron algún tipo de lesión hepática, a excepción de los ejemplares mencionados, no registraron niveles de organoclorados en el hígado. Las lesiones hepáticas observadas en las cinco tortugas que presentaron niveles de organoclorados en el hígado (degeneración vacuolar hepática moderada, necrosis en lóbulo derecho, hepatitis purulenta multifocal y hepatitis granulomatosa multifocal) probablemente no se relacionan con la presencia de estos compuestos en el tejido. A pesar de lo anterior, no puede descartarse que los organoclorados puedan ejercer efectos crónicos más o menos adversos en función de lo vulnerable que se encuentre el organismo según su condición a la hora de actuar. Ninguna de las tortugas de nuestro estudio superó la etapa de vida juvenil, lo que impide establecer cualquier tipo de relación entre los niveles de organoclorados observados y los efectos crónicos que puedan ejercer en el organismo a largo plazo. Aunque no se observaron lesiones hepáticas, las tortugas en las que se detectaron niveles importantes de organoclorados presentaron frecuentemente un importante cuadro septicémico, lo que puede sugerir, de acuerdo con otros autores, si entre alguno de los efectos no visibles a corto plazo de los organoclorados se encuentra el efecto inmunosupresor (RYBITSKI *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1999; ALAM & BRIM, 2000; KELLER *et al.*, 2004).

Los datos aportados por las tortugas incluidas en este estudio no permiten obtener ninguna conclusión sobre la posible relación entre los niveles de organoclorados y la edad de los individuos. Ello se debe a que todos los ejemplares se identificaron como juveniles pelágicas y juveniles. Según la bibliografía consultada existe una relación directa entre la edad y los niveles de organoclorados detectados en tortugas boba (HERBERT *et al.*, 1993). La relación inversa detectada por MCKENZIE *et al.* (1999) se justifica por tratarse de tortugas verdes y los hábitos herbívoros que éstas adoptan al alcanzar la etapa adulta. La relación positiva entre la edad y la concentración de contaminantes ha sido descrita también en diferentes especies de mamíferos marinos (TANABE *et al.*, 1987b; AGUILAR & BORRELL, 1988; COCKCROFT *et al.*, 1989; AGUILAR *et al.*, 1999). Si bien en un estudio realizado por TANABE *et al.* (1997a,b) en marsopas del Mar Negro las hembras maduras mostraron niveles inferiores respecto a los mismos contaminantes en ejemplares más jóvenes, estas bajas concentraciones fueron explicadas por la transferencia durante la lactancia de estos

compuestos a sus descendientes tal como ocurre en el caso de las tortugas marinas hembras a los huevos (MCKENZIE *et al.*, 1999), confirmando la relación directa entre los niveles de organoclorados y la edad del individuo los resultados obtenidos de los ejemplares machos empleados en el mismo estudio.

Respecto a la posible relación entre los niveles de PCBs y la LRC, los resultados obtenidos en nuestro estudio no establecen ningún tipo de modelo a seguir. Estudios realizados en tortugas mordedoras de agua dulce establecen una correlación positiva entre la concentración de contaminantes en los distintos tejidos y la longitud del caparazón (MCKENZIE *et al.*, 1999), observando una mayor correlación para los congéneres de PCBs más lipofílicos (HERBERT *et al.*, 1993). Lo contrario se observó en el estudio realizado sobre tortugas verdes por MCKENZIE *et al.*, (1999) cuya explicación se basa en el cambio desde una dieta omnívora en los primeros estadios de vida hacia una dieta casi exclusivamente herbívora al alcanzar la etapa adulta (GODLEY *et al.*, 1997).

En el estudio realizado sobre la detección de organoclorados en las muestras de sangre de las tortugas marinas llegadas a nuestras costas, se registraron niveles muy inferiores respecto a los detectados en los tejidos adiposos y hepáticos. Aun no contando con un número representativo de muestras del que se puedan extraer datos para los tres tipos tejidos analizados, se puede afirmar que los niveles detectados en las muestras de sangre resultaron muy inferiores a los detectados en los tejidos adiposo y hepático. Actualmente son varios los estudios encaminados a optimizar la detección de organoclorados en muestras de sangre. Ello conduciría a ampliar las posibilidades de estudio de los efectos de los organoclorados en las tortugas marinas al poder estudiar casos de tortugas vivas (KELLER *et al.* 2004).

Respecto al estudio preliminar llevado a cabo sobre la SPME como metodología alternativa en el estudio de los niveles de organoclorados detectados en muestras de tejido animal, si bien los primeros resultados obtenidos no resultan concluyentes ni comparables a los obtenidos según los métodos convencionales, sí que podemos aportar, basándonos en éstos, las primeras pautas a tener en cuenta. Según el presente estudio los resultados resultaron más certeros si mantenemos la muestra resuspendida en agua y no en ningún otro disolvente orgánico que pueda presentar mayor afinidad por los organoclorados que la

propia fibra de SPME. Durante la fase de extracción se comprobó cómo el uso del soxhlet y de 200 ml de hexano como disolvente proporciona mejores resultados que los obtenidos siguiendo ensayos similares consultados en la bibliografía (PROSEN & ZUPANCIC-KRALJ, 1999; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; PITARCH, 2001; PEÑALVER, 2002). Así como una adsorción de 45 minutos con agitación y sin adición de sales. El mayor volumen de muestra requerido, respecto a muestras de diferente naturaleza, para la detección de organoclorados en tejido animal y lo complicado de su composición frente a otros tipos de analitos, nos obliga desde nuestro punto de vista, a realizar una comprobación del estado de la fibra cada cierto número de muestras mediante desorción a altas temperaturas, que nos garantice la no contaminación de la misma.

Las distintas variables que afectan al proceso del análisis hacen que sea necesario continuar con un estudio detallado de cada una de ellas con el fin de garantizar la optimización de la metodología y la obtención de resultados fiables que permitan en un futuro considerar la SPME como una herramienta fundamental en la detección de compuestos organoclorados en muestras de tejido animal.





СОНУДС-ОЗЕС

## 6. CONCLUSIONES

1. Las concentraciones de compuestos organoclorados detectadas en las tortugas marinas varadas en las Islas Canarias alcanzaron niveles superiores a los publicados en tortugas bobas de otras áreas geográficas e inferiores a los detectados en mamíferos marinos.
2. Los niveles de organoclorados observados resultaron mayores en el tejido hepático que en el tejido adiposo en tortugas septicémicas y/o caquéticas, lo que confirma la relación entre el estado general del animal y la distribución y concentración de organoclorados en el organismo.
3. El principal grupo de organoclorados detectado fue el de los PCBs, destacando por su prevalencia y concentraciones los pertenecientes a los grupos hexaclorobifenil, heptaclorobifenil y decaclorobifenil, entre los que se encuentran los congéneres 180, 153, 138 y 209.
4. La detección del congénere 209 en niveles elevados en el tejido hepático de tortugas de nuestro estudio supone la primera referencia destacable de la presencia de este organoclorado en tortugas marinas.

5. Las causas derivadas de la actividad humana se presentan como la principal causa de mortalidad en tortugas marinas en las Islas Canarias, destacando la ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca (37.5 %), enmallamientos en artes de pesca (21.87 %) y traumatismos contra embarcaciones (12.5 %). Esta casuística accidental junto a la edad juvenil de las tortugas analizadas no permite establecer una evidente relación entre las concentraciones de organoclorados detectadas y las causas de muerte, no descartándose posibles efectos crónicos.





## 7. RESUMEN

Con el fin de determinar los niveles y compuestos organoclorados (PCBs y DDTs) que existen en los tejidos de las tortugas marinas varadas en las Islas Canarias y establecer una posible relación entre dichas concentraciones y las causas de muerte, se analizaron 32 tortugas marinas (30 ejemplares de *Caretta caretta*, 1 ejemplar de *Chelonia mydas* y 1 ejemplar de *Dermochelys coriacea*). Tras la necropsia de los ejemplares se procedió a analizar muestras de hígado y tejido adiposo de cada ejemplar mediante la extracción de grasa, purificación de la muestra y detección mediante cromatografía de gases.

Los resultados obtenidos indicaron niveles de organoclorados superiores a los observados en tortugas marinas en otras áreas geográficas e inferiores a los detectados en mamíferos marinos. Los niveles de organoclorados detectados resultaron mayores en el tejido hepático que en el tejido adiposo en tortugas septicémicas y/o caquéticas, lo que confirma la relación entre el estado general del animal y la distribución y concentración de organoclorados en el organismo.

El principal grupo de organoclorados detectado fue el de los PCBs, destacando por su prevalencia y concentraciones los pertenecientes a los grupos hexaclorobifenil, heptaclorobifenil y decaclorobifenil, entre los que se encuentran los congéneres 180, 153, 138 y 209. La detección del congénere 209 en niveles elevados en el tejido

hepático de tortugas de nuestro estudio supone la primera referencia destacable de la presencia de este organoclorado en tortugas marinas. Los DDTs no se detectaron en un número importante de las muestras, siendo el 2,4'-DDD el más frecuente y de mayor nivel. El 2,4'-DDE prácticamente no se detectó en ninguna de las muestras analizadas.

Según los resultados observados, las causas derivadas de la actividad humana se presentaron como la principal causa de mortalidad en tortugas marinas en las Islas Canarias, destacando la ingestión de anzuelos y monofilamentos de pesca (37.5 %), los enmallamientos en artes de pesca (21.87 %) y los traumatismos contra embarcaciones (12.5 %). Esta casuística accidental junto a la edad juvenil de las tortugas analizadas no permitió establecer una evidente relación entre las concentraciones de organoclorados detectadas y las causas de muerte, no descartándose posibles efectos crónicos.

También se realizó como alternativa metodológica un estudio preliminar de detección de organoclorados en tejido animal mediante la microextracción en fase sólida (SPME). Aunque los primeros resultados obtenidos no resultaron concluyentes, se consiguieron mejores resultados con la resuspensión de la muestra en agua, el uso del soxhlet, y la absorción durante 45 minutos con agitación y sin adicción de sales, siendo necesario estudios adicionales sobre cada una de las distintas variables que afectan al proceso del análisis.





## SUMMARY

## 8. SUMMARY

Aiming at assessing the organochlorine levels and compounds (PCBs and DDTs) that exist in the tissues of marine turtles stranded in the Canary Islands and at establishing a possible relation between such concentrations and death causes, 32 marine turtles (30 specimen of *Caretta caretta*, 1 specimen of *Chelonia mydas* and one specimen of *Dermochelys coriacea*) have been analysed. After necropsy of the specimen, liver and adipose tissue samples of each specimen were analysed by the extraction of fat, purification of the sample and detection through gas chromatography.

The results obtained showed higher organochlorine levels than those found in marine turtles from other geographical areas and lower than those detected in marine mammals. The detected organochlorine levels were higher in liver tissue than in adipose tissue in septicaemic or cachexic turtles, fact that confirms the relation between the general state of the animal and the distribution and concentration of organochlorines in the organism.

The main organochlorine group was that of the PCBs, being the most relevant for their prevalence and concentrations those belonging to the hexachlorobiphenyl, heptachlorobiphenyl and decachlorobiphenyl groups, among which congeners 180, 153,



138 and 209 are found. The detection of congener 209 in high levels in the liver tissue of the turtles of our study stands as the first noticeable reference of the presence of this organochlorine in marine turtles. The DDTs were not detected in an important number of samples, being the 2,4'-DDD the most frequent and the highest in level. The 2,4'-DDE was not detected in any of the analysed samples.

In our study, causes derived from human activity were presented as the main reason for the death of marine turtles in the Canary Islands, being the most frequent ones the ingestion of hooks and fishing monofilaments (37.5 %), getting trapped in fishing nets (21.87 %) and hitting against boats (12.5). This accident casuistry together with the young age of the analysed turtles did not allow the establishment of an clear relation between the detected concentrations of organochlorines and the causes of death. Possible chronic effects are not discarded.

A preliminary study of the detection of organochlorines in animal tissue through solid phase microextraction (SPME) was also carried out as a methodological alternative. Although the first results were not conclusive, better outcomes were achieved with resuspension of the water sample, the use of soxhlet and the absorption during 45 minutes with agitation and without the adding of salts. Supplementary studies on each of the different variants which affect the process of analysis are necessary.



AGRADECIMIENTOS

## 9. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al **Dr. Jorge Orós** su apoyo incondicional y la gran confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Óscar González**, agradecer enormemente toda la ayuda prestada y su continua y contagiosa motivación.

Al **Dr. Javier Araña** y miembros del Centro Instrumental Químico-Físico para el Desarrollo de la Investigación Aplicada (CIDIA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su fundamental colaboración.

A **Pascual Calabuig**, por su continua colaboración desde el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (Cabildo de Gran Canaria).

A las **Dras. Soraya Déniz y Begoña Acosta** de la Unidad de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC, por su colaboración en la realización de los estudios microbiológicos.

Al **Dr. Antonio Ruiz**, por su colaboración desde la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC.

Al personal de la Granja de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC y en especial al **Dr. Rafael Ginés**, por su desinteresada y continua colaboración.

Al **Dr. Octavio Luzardo**, del Departamento de Toxicología de la ULPGC, por la colaboración y la ayuda prestada.

Al **Dr. Kannan** de manera especial, y al **Dr. Aguilar**, por responder fielmente a todas las preguntas realizadas y su gran disposición a ofrecer cualquier ayuda.

A **Moisés**, por su crucial ayuda en los primeros pasos y su enorme y motivador interés.

A **Ana Beltrá**, por el diseño de la portada, y a **Victor Armas** por su amable y eficaz colaboración; y en general, a todas aquellas personas con las que he coincidido estos cuatro años y que colaboraron de alguna manera en la realización de este trabajo.

A mi familia, en especial a mi hermana **Inma**, por toda su ayuda y apoyo incondicional.

A mis amigos, por acompañarme en todo momento, en especial a **Jose Medina** y **Andamana Bautista** por su apoyo moral y profesional, y a **Armiche**, por compartir los primeros e inciertos momentos en la elaboración de este trabajo.

A **Caru**, por estar cada día y alegrar cada momento.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación parcial de la Dirección General de Política Territorial y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias, al Ministerio de Ciencia y Tecnología, a través de su Dirección General de Investigación (REN2000-1753MAR), y al Ministerio de Educación y Ciencia por la dotación de una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU).





## 10. BIBLIOGRAFÍA

**ACGIH, AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. 1996.** Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological indices for 1995/1996. Dichlorobenzenes. *Cincinnati, OH*, 18-19.

**ACHMAN, D. R., HORNBUCKLE, K. C., & EISENREICH, S. J. 1993.** Volatilization of polychlorinated biphenyls from Green Bay, Lake Michigan. *Environmental Science & Technology*, 27:75-87.

**ADDISON, R. F. 1989.** Organochlorines and marine mammal reproduction. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46:360-368.

**ADDISON, R. F., & BRODIE, P. F. 1977.** Organochlorine residues in maternal blubber, milk, and pup blubber from grey seals (*Halichoerus grypus*) from Sable Island, Nova Scotia. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34:937-941.

**ADDISON, R. F., BRODIE,, P. F., ZINCK, M. E., & SERGEANT, D. E. 1984.** DDT has declined more than PCBs in eastern Canadian seals during the 1970s. *Environmental Science & Technology*, 18:935-937.

**ADNYANA, W., LADDS, P. W., & BLAIR, D. 1997.** Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. *Australian Veterinary Journal*, 75 (10): 737-742.

**AGUILAR, A. 1984.** Relationship of DDE/tDDT in marine mammals to the chronology of DDT input into the ecosystem. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41:840-844.

**AGUILAR, A. 1985.** Compartmentation and reliability of sampling procedures in organochlorine pollution surveys of cetaceans. *Residue Reviews*, 95:91-114.

**AGUILAR, A. 1987.** Using organochlorine pollutants to discriminate marine mammal populations: a Review and critique of the methods. *Marine Mammal Science*, 3:242-262.

**AGUILAR, A., & BORREL, A. 1988.** Age- and sex-related changes in organochlorine compound levels in fin whales (*Balaenoptera physalus*) from the eastern North Atlantic. *Marine Environmental Research*, 25:195-211.

**AGUILAR, A., & BORREL, A. 1994b.** Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Science of the Total Environment*, 154(2-3):237-247.

**AGUILAR, A., & BORREL, A. 1994c.** Reproductive transfer and variation of body load of organochlorine pollutants with age in fin whales (*Balaenoptera physalus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27(4):546-554.

**AGUILAR, A., BORREL, A., & PASTOR, T. 1999.** Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. *Journal of Cetacean Research and Management*, (Special Issue 1):83-116.

**AGUILAR, A., & RAGA, J. A. 1993.** The striped dolphin epizootic in the Mediterranean Sea. *Ambio*, 22:524-528.

**AGUIRRE, A. A. 1991.** Green turtle fibropapilloma: an epidemiologic perspective. pp. 107-113. En : **BALAZS, G. H., & POOLEY, S. G. (EDS.).** Research plan for marine turtle fibropapilloma. U.S. Department of Commerce, NOAA Tech. Memo. NMFS-SWFSC-156.

**AGUIRRE, A. A., BALAZS, G. H., SPRAKER, T. R., & GROSS, T. S. 1995.** Adrenal and haematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiological Zoology*, 68:831-854.

**AGUIRRE, A. A., BALAZS, G. H., ZIMMERMAN, B., & GALEY, F. D. 1994.** Organic contaminants and trace metals in tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. *Marine Pollution Bulletin*, 28 (2): 109-114.

- AGUIRRE, A. A., BALAZS, G. H., ZIMMERMAN, B., & SPRAKER, T. R. 1994. Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(1):8-15.
- AGUIRRE, A. A., SPRAKER, T. R., BALAZS, G. H., & ZIMMERMAN, B. 1998. Spirorchidiasis and fibropapillomatosis in green turtles from the Hawaiian Islands. *Journal of Wildlife Diseases*, 34 (1): 91-98.
- AHLBORG, U.G., LIPWORTH, L., & TITUS-ERNSTOFF, C.C. 1995. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 25:463-467.
- ALAM, S. K., & BRIM, M. S. 2000. Organochlorine, PCB, PAH, and metal concentrations in eggs of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from northwest Florida, USA. *Journal of Environmental Science and Health*, B35(6):705-724.
- ALBERS, P. H., SILEO, L., & MULHERN, B. M. 1986. Effects of environmental contaminants on snapping turtles of a tidal wetland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 15:39-49.
- ANDERSON, R. S. 1989. Effects of pollutant-exposure on hemocyte-mediated immune function. *The Journal of Shellfish Research*, 8:435-436.
- ANDERSSON, Ö., & WARTANIAN, A. 1992. Levels of polychlorinated camphenes (Toxaphene), chlordane compounds and polybrominated diphenyl ethers in seals from Swedish waters. *Ambio*, 21, 550-552.
- ARENA, J. M. 1970. Poisoning: Toxicology, Symptoms, Treatment. En: CHARLES C. THOMAS (EDS.). Springfield.
- ARNOLD, D. L., MES, J., BRYCE, F., KARPINSKI, K., BICKIS, M. G., & ZAWIDZKA, Z. Z. 1990. A pilot study on the effects of Aroclor 1254 ingestion by rhesus and cynomolgus monkeys as a model for human ingestion of PCBs. *Food and Chemical Toxicology*, 28:847-857.
- ARNOLD, S. F., BERGERON, J. M., TRAN, D. Q., COLINS, B. M., VONIER, P. M., CREWS, D., TOSCANO JR., W. A., & McLACHLAN, J. A. 1997. Synergistic responses of steroidal estrogens *in vitro* (yeast) and *in vivo* (turtles). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235:336-342.
- ARTHUR, C. L., & PAWLISZYN, J. 1990. Solid-phase micro-extraction with thermal desorption using fused-silica optical fibres. *Anal Chem*, 62:2145-2148.



ATLAS, E., BIDLEMAN, T., & GIAM, C. S. 1986. Atmospheric transport of PCBs to the oceans. pp.: 79-100. En: WAID, J. S. (EDS.). PCBs and the environment. *CRC Press, Boca Ratón, Fla.*

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. 1996. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls. *Final. U.S. Department of Health and Human Services.*

AUGER, J., KUNSTMANN, J. M., CZYGLIK, F., & JOUANNET, P. 1994. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *The New England Journal of Medicine*, 332:281-285.

AULERICH, R. J., BURSIA, S. J., BRESLIN, W. J., OLSON, B. A., & RINGER, R. K. 1985. Toxicological manifestations of 2,4,5-, 2',4',5'-, 2,3,6,2',3',6'- and 3,4,5,3',4',5'-hexachlorobiphenyl and Aroclor 1254 in mink. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 15:63-79.

AZNAR, F. J., BALBUENA, J. A., & RAGA, J. A. 1994. Are epizootics biological indicators of a western Mediterranean striped dolphin die-off? *Disease of Aquatic Organisms*, 18:159-163.

BACON, C. E., JARMAN, W. M., & COSTA, D. P. 1992. Organochlorine and polychlorinated biphenyl levels in pinniped milk from the Arctic, the Antarctic, California and Australia. *Chemosphere*, 24:779-791.

BALAZS, G. H. 1991. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. pp. 47-57. En: BALAZS, G. H., & POOLEY, S. G. (EDS.): Research Plan for Marine Turtle Fibropapilloma. *NOAA-Technical Memorandum NMFS-SWFC-156. Honolulu, Hawaii.*

BALAZS, G. H., & POLEY, S. G. 1991. Research Plan for Marine Turtle Fibropapilloma. *US Department of Commerce / National Oceanic & Atmospheric Administration / National Marine Fisheries Service. NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-156. Honolulu, Hawaii.* 113 pp.

BANNISTER, R., DAVIS, D., ZACHAREWAKI, T., TIZARD, I., & SAFE, S. 1987. Aroclor 1254 as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin antagonist: effects on enzyme induction and immunotoxicity. *Toxicology*, 46:28-42.

BANNISTER, R., & SAFE, S. 1987. Synergistic interactions of 2,3,7,8-TCDD and 2,2',4,4',5,5',-hexachlorobiphenyl in C57BL/6J and DBA/2J mice: role of the Ah receptor. *Toxicology*, 44:159-169.

BANSEL, S. K., VERMA, S. R., GUPTA, A. K., & DALELA, R. C., 1979. Physiological dysfunction of the haemopoietic system in a fresh water teleost, *Labeo rohita*, following chronic chlordane exposure. Part II: Alterations in certain organic components and serum electrolytes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 22:674-680.

- BARBADILLO, L. J., LACOMBA, J. I., PÉREZ-MELLADO, V., SANCHO, V., & LÓPEZ-JURADO, L. F. 1999.** Anfibios y Reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. *Geoplaneta, Barcelona*. 419 pp.
- BECKMAN, K. B., YLITALO, G. M., TOWELL, R. G., KRAHN, M. M., O'HARA, T. M., & BLAKE, J. E. 1999.** Factors affecting organochlorine contaminant concentrations in milk and blood of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) dams and pups from St. George Island, Alaska. *Science of the Total Environment*, 231:183-200.
- BELAND, P., DE GUISE, S., GIRARD, C., LAGACEA, A., MARTINEAU, D., MICHAUD, R., MUIR, D. C. G., NORSTROM, R. J., PELLETIER, E., RAY, S., & SHUGART, L. R. 1993.** Toxic compounds and health and reproductive effects in St. Lawrence beluga whales. *Journal of Great Lakes Research*, 19:766-777.
- BELARDI, R. P., & PAWLISZYN, J. 1989.** The application of chemically modified fused silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 24:179-191.
- BELTRAN, J., LÓPEZ, F. J., & HERNÁNDEZ, F. 2000.** Solid phase microextraction in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 885:389-404.
- BENÍTEZ, J. A., & BÁRCENAS, C. 1996.** Patrones de uso de los plaguicidas en la zona costera del Golfo de México. pp.: 155-167. En: **BOTELLO, A. V., ROJAS, J. L., BENÍTEZ, J. A., & ZÁRATE-LOMELÍ, D. (EDS).** Golfo de México, Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias. *México: EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche*.
- BERGERON, J. M., CREWS, D., & MCLACHLAN, J. A. 1994.** PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environmental Health Perspectives*, 102(9):780-781.
- BERGMAN, A., & OLSSON, M. 1986.** Pathology of Baltic grey seal and ringed seal females with special reference to adrenocortical hyperplasia: Is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome? *Finnish Game Research*, 44:47-62.
- BERN, H. A. 1992.** The fragile fetus. pp: 9-15. En: **COLBORN, T., CLEMENT, C. (EDS).** Chemically Induced Alterations in Sexual and Funcional Development: The Wildlife/Human Connection. *Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ*.
- BERNARD, H. J., & HOHN, A. A. 1989.** Differences in feeding habits between pregnant and lactating spotted dolphins (*Stenella attenuata*). *Journal of Mammalogy*, 70(1):211-215.

- BERNHOF, A., & SKAARE, J. U. 1994.** Levels of selected individual polychlorinated biphenyls in different tissues of harbour seals (*Phoca vitulina*) from the southern coast of Norway. *Environmental Pollution*, 86:99-107.
- BIDLEMAN, T. F., PATTON, G. W., WALLA, M. D., HARGRAVE, B. T., VASS, W. P., ERICKSON, P., FOWLER, B., SCOTT, V., & GREGOR, D. J. 1989.** Toxaphene and other organochlorines in Arctic Ocean fauna: evidence for atmospheric delivery. *Arctic*, 42:307-313.
- BIRNBAUM, L. S. 1985.** The role of structure in the disposition of halogenated aromatic xenobiotics. *Environmental Health Perspectives*, 61:11-20.
- BIRNBAUM, L. S. 1994.** Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: Implications for policy and future research. *Environ Health Perspectives*, 102:676-679.
- BISHOP, C. A., BROOK, R. J., CAREY, J. H., MING, P., NORSTROM, R. J., & LEAN, D. R. S. 1991.** The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) from Ontario, Canada. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 33: 521-547.
- BISHOP, C. A., BROWN, G. P., BROOK, R. J., LEAN, D. R. S., & CAREY, J. H. 1994.** Organochlorine contaminant concentrations in eggs and their relationship to body size, and clutch characteristics of the female common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) in Lake Ontario, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27:82-87.
- BISHOP, C. A., & GENDRON, A. D. 1998.** Reptiles and amphibians: shy and sensitive vertebrates of the Great Lakes basin and St. Lawrence River. *Environmental Monitoring & Assessment*, 53: 225-244.
- BISHOP, C. A., LEAN, D. R. S., BROOK, R. J., CAREY, J. H., & NG, P. 1995.** Chlorinated hydrocarbons in early life stages of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from a coastal wetland on Lake Ontario, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(3):421-426.
- BISHOP, C. A., NG, P., NORSTROM, R. J., BROOKS, R. J., & PETTIT, K. E. 1996.** Temporal and geographic variation of organochlorine residues in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) and comparisons in PCB patterns in herring gulls (*Larus argentatus*) in the Great Lakes basin in Ontario, Canada (1981-1991). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(4):512-524.
- BISHOP, C. A., NG, P., PETTIT, K. E., KENNEDY, S., STEGEMAN, J. J., NORSTOM, R. J., & BROOKS, R. J. 1998.** Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the

common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes-St. Lawrence River basin (1989-91). *Environmental Pollution*, 99:1-14.

**BISHOP, C. A., & PETTIT, K. E. 1992.** Declines in Canadian Amphibian Populations: Designing a National Monitoring Strategy. *Occasional Paper Number 76. Canadian Wildlife Service, Ottawa.*

**BISHOP, C. A., & ROUSE, J. D. 2000.** Chlorinated hydrocarbon concentrations in plasma of the Lake Eric water snake (*Nerodia sipedon insularum*) and northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*) from the Great Lakes basin in 1998. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39:500-505.

**BJORNDAL, K. A. 1997.** Foraging ecology and nutrition of sea turtles. pp. 199-231. En: **LUTZ, P. L., & MUSICK, J. A. (EDS.)**. The biology of sea turtles. *Boca Raton: CRC Press.*

**BJORNDAL, K. A., BOLTEN, A. B., KOIKE, B., SCHROEDER, B. A., SHAVER, D. I., TEAS, W. G., & WITZELL, W. N. 2001.** Somatic growth function for immature loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in southeastern U. S. waters - Statistical Data included. *Fishery Bulletin*, 99:240-246.

**BLANCO, J. C., & GONZÁLEZ, J. L. 1992.** *Libro Rojo de los Vertebrados Españoles*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Colección Técnica ICONA, Madrid. 704 pp.

**BLUMTON, A. K., FRASER, J. D., YOUNG, R. W., GOODBRED, S., PORTER, S. L., & LUUKKONEN, D. L. 1990.** Pesticide and PCB residues for loggerhead shrikes in the Shenandoah Valley, Virginia 1985-88. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45:697-702.

**BLUS, L. J. 1996.** DDT, DDD, and DDE in Birds. pp.:49-73. En: **BEYER, W. N., HEINZ, G. H., & REDMON-NORWOOD, A. W. (EDS.)**. Environmental Contaminants in Wildlife. Interpreting Tissue Concentrations. Cap. 2. *CRC. Lewis Publishers. Boca Ratón, New York, London, Tokio.*

**BOER, J. 1988.** Chlorobiphenyls in bound and non-bound lipids of fishes; comparison of different extraction methods. *Chemosphere*, 17:1803-1810.

**BOLL, M., WEBER, L.W. D., MESSNER, B., & STAMPM, A. 1998.** Polychlorinated biphenyls affect the activities of gluconeogenic and lipogenic enzymes in rat liver, is there an interference with regulatory hormone actions? *Xenobiotica*, 28:479-492.

**BOLTEN, A. B., JACOBSON, E. R., & BJORNDAL, K. A. 1992.** Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *American Journal of Veterinary Research*, 53:2224-2227.

**BONIN, J., DESGRANGES, J. L., BISHOP, C. A., RODRIGUE, J., GENDRON, A., & ELLIOT, J. E. 1995.** Comparative study of contaminants in the mudpuppy (Amphibia) and the common snapping turtle (Reptilia), St. Lawrence River, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28:184-194.

**BOON, J. P., & EIJGENRAAM, F. 1988.** The possible role of metabolism in determining patterns of PCB congeners in species from the Dutch Wadden Sea. *Marine Environmental Research*, 24:3-8.

**BOON, J. P., OOSTINGH, I., VAN DER MEER, J., & HILLEBRAND, M. T. J. 1994.** A model for bioaccumulation of chlorobiphenyl congeners in marine mammals. *European Journal of Pharmacology*, 270:237-251.

**BOON, J. P., VAN ARNHEM, E., JANSEN, S., KANNAN, N., PETRICK, G., SCHULZ, D., DUINKER, J. C., REIJNDERS, P. J. H., & GOKSOYR. 1992.** The toxicokinetics of PCBs in marine mammals with special reference to possible interactions of individual congeners with the cytochrome P450-dependent monooxygenase system: an overview. pp. 119-159. En: **WALKER, C. H., & LIVINGSTONE, D. R. (EDS.).** Persisten pollutants in marine ecosystems. *Pergamon, Oxford*.

**BORGMANN, U., NORWOOD, W. P., & RALPH, K. M. 1990.** Chronic toxicity and bioaccumulation of 2,5,2',5'- and 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl and Aroclor® 1242 in the amphipod *Hyaella azteca*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19:558-564.

**BORLAKOGLU, J .T., & HAEGELE, K. D. 1991.** Comparative aspects on the bioaccumulation, metabolism, and toxicity with PCBs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C:327-338.

**BORRELL, A. 1993a.** Dinàmica dels compostos organoclorats en la balena d'aleta el cap d'olla d'aleta llarga i el dofí llistat d'aigües atlàntiques i mediterrànies. *Ph.D. Thesis, University of Barcelona*, 398pp.

**BORRELL, A., & AGUILAR, A. 1990.** Loss of organochlorine compounds in the tissues of a decomposing stranded dolphin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45:46-53.

**BORRELL, A., & AGUILAR, A. 1999.** A review of organochlorine and metal pollutants in marine mammals from Central and South America. *Journal of Cetacean Research and Management*, 23:195-207.

**BORRELL, A., AGUILAR, A., CORSOLINI, S., & FOCARDI, S. 1996.** Evaluation of toxicity and sex-related variation of PCB levels in mediterranean stiped dolphin affected by an epizootic. *Chemosphere*, 32(12):2359-2369.

**BORRELL, A., AGUILAR, A., & PASTOR, T. 1997.** Organochlorine Pollutant Levels in Mediterranean Monk Seals from the Western Mediterranean and the Sahara Coast. *Marine Pollution Bulletin*, 34(7):505-

510.

**BORRELL, A., BLOCH, D., & DESPORTES, G. 1995.** Age trends and reproductive transfer of organochlorine compounds in long-finned pilot whales from the Faroe Islands. *Environmental Pollution*, 88(3):283-292.

**BORRELL, A., PASTOR, T., AGUILAR, A., CORCUERA, J., & MONZÓN, F. 1996.** DDT and PCBs in *Pontoporia blainvillei* from Argentina. Age and sex trends. *European Research on Cetaceans*, 9:273-276.

**BRANSON, D. R. 1977.** A new capacitor fluid – a case study in product stewardship. pp. 44-61. En: **MAYER, F. L., & HAMELINK, J. L. (EDS.)**. Aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM STP 634. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.*

**BRODIE, P. F. 1975.** Cetacean energetics, an overview of intraspecific size variation. *Ecology*, 56(1):152-161.

**BROOKS, D. E., GINN, P. E., MILLER, T. R., BRAMSON, L., & JACOBSON, E. R. 1994.** Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology*, 31: 335-339.

**BROWN, A. W. A. 1978.** Ecology of pesticides. *New York: John Wiley and Sons Inc.*

**BROWN, M. P., WERNER, M. B., SLOAN, R. J., & SIMPSON, K. W. 1985.** Polychlorinated biphenyls in the Hudson River. *Environmental Science & Technology*, 19: 656-661.

**BRUNNER, M. J., SULLIVAN, T. M., & SINGER, A. W. 1996.** An Assessment of the Chronic Toxicity and Oncogenicity of Aroclor-1016, Aroclor-1242, Aroclor-1254, and Aroclor-1260 Administered in Diet to Rats. *Columbus: Battelle Study No. SC920192, Chronic toxicity and oncogenicity report.*

**BRUNSTOM, B., & ORBERG, J. 1982.** A method for studying embryotoxicity of lipophilic substances experimentally introduced into hens' eggs. *Ambio.*, 11:209-211.

**BRYAN, A. M., OLAFSSON, P. G., & STONE, W. B. 1987a.** Disposition of low and high environmental concentrations of PCBs in snapping turtle tissues. *Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology*, 38:1000-1005.

**BRYAN, A. M., STONE, W. B., & OLAFSSON, P. G. 1987b.** Disposition of toxic PCB congeners in snapping turtle eggs: Expressed as toxic equivalents of TCDD. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39:791-796.

**CALABUIG, P. 1998.** Recuperación de tortugas marinas accidentadas en las Islas Canarias. *Memoria de Actividades Realizadas en el Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre de Tafira. Cabildo de Gran Canaria, Área de Medio Ambiente.* 35 pp.

**CALAMBOKIDIS, J., & BARLOW, J. 1991.** Chlorinated hydrocarbon concentrations and their use in describing population discreteness in harbor porpoises from Washington, Oregon, and California. pp. 101-110. En: **REYNOLDS III, J. E., & ODELL, D. K. (EDS.),** *NOAA Tech. Rep., NMFS 98.*

**CAMPBELL, T.W. 1996.** Clinical pathology. pp: 248-257. En: **MADER DR., (ED.)**. *Reptile Medicine and Surgery Philadelphia, W.B. Saunders Company.*

**CANNON, L. R. G., & BERRY, G. N. 1981.** The life history of *Sulcascaris sulcata* (Nematoda: Ascaridoidea), a parasite of marine molluscs and turtles. *International Journal for Parasitology*, 11:43-54.

**CARLSEN, E., GIWERCMAN, A., KEIDING, N., & SKAKKEBACK, N. E. 1992.** Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal*, 305:609-613.

**CARLSON, R. 1962.** Silent spring. *Penguin Books: Harmondsworth (Great Britain).*

**CARLSON, R. W., & DUBY, R. T. 1973.** Embryotoxic effects of three PCBs in the chicken. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 9:261-264.

**CASEY, R. N., QUACKENBUSH, S. L., WORK, T. M., BALAZS, G. H., BOWSER, P. R., & CASEY, J. W. 1996.** Identification of retroviruses associated with unaffected green sea turtles and turtles with fibropapillomas. *Aquavet*, 20: 14-17.

**CASEY, R. N., QUACKENBUSH, S. L., WORK, T. M., BALAZS, G. H., BOWSER, P. R., & CASEY, J. W. 1997.** Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian Islands. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31: 1-7.

**CHEN, T. T., REID, P. C., VAN BENEDEN, V., & SONSTEGARD, R. A. 1986.** Effects of Aroclor 1254 and mirex on stradiol-induced vitellogenin production in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43:169-173.

**CHRISTIE, W. W. 1982.** Lipid analysis: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. *2nd ed. Pergamon Press Ltd., Oxford, England.*

**CHU, I., VILLENEUYE, D. C., YAGMINAS, A., LECAYALIER, P., POON, R., & FEELEY, M. 1994.** Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-penta-chlorobiphenyl in the rat. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological changes. *Fundamental and Applied Toxicology*, 22:457-468.

**CICERO, A. M. 1992.** La contaminazione dei prodotti della pesca, alcune considerazioni sui livelli di policlorobifenili (PCB) e DDT nel tessuto muscolare ed epatico di ricciola. *Mare Nostrum, Suppl. ord. GU 202, 30 agosto 1990*, pp. 14-15.

**CLARK JR., D. R. 1981.** Bats and environmental contaminants: a Reviews. *U.S. Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report –Wildlife*, 325:1-27.

**CLARK JR., D. R., & KROLL, J. C. 1977.** Effects of DDE on experimentally poisoned free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*): lethal brain concentrations. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 3:893-901.

**CLARK JR., D. R., & KRYNITSKY, A. J. 1980.** Fish, wildlife and estuaries: organochlorine residues in eggs of loggerhead and green sea turtles nesting at Merritt Island, Florida - July and August 1976. *Pesticides Monitoring Journal*, 14:7-10.

**CLARK JR., D. R., & KRYNITSKY, A. J. 1985.** DDE residues and artificial incubation of loggerhead sea turtle eggs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 34:121-125.

**CLARK JR., D. R., & STAFFORD, C. J. 1981.** Effects of DDE and PCB (Aroclor 1260) on experimentally poisoned female little brown bats (*Myotis lucifugus*): lethal brain concentrations. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 7:925-934.

**CLARKE, M. R., MARTINS, H. R., & PASCOE, P. 1993.** The diet of sperm whales (*Physeter macrocephalus* Linnaeus 1758) off the Azores. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science*, 339(1287):67-82.

**CLELAND, G. B., MCELROY, P. J., & SONSTEGARD, R. A. 1988a.** The effect of dietary exposure to Aroclor 1254 and/or mirex on humoral immune expression of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicology (Amst.)*, 12:141-146.

**CLELAND, G. B., OLIVER, B. G., & SONSTEGARD, R. A. 1988b.** Dietary exposure of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to Great Lakes coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). Bioaccumulation of halogenated aromatic hydrocarbons and host resistance studies. *Aquatic Toxicology (Amst.)*, 13:281-290.



- CLELAND, G. B., & SONSTEGARD, R. A. 1987. Natural killer cell activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of dietary exposure to Aroclor 1254 and/or mirex. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44:636-638.
- COBB, G. P., & WOOD, P. D. 1997. PCB concentrations in eggs and chorioallantoic membranes of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Cape Romain National Wildlife Refuge. *Chemosphere*, 34(3): 539-549.
- COCKCROFT, V. G., DE KOCK, A. C., LORD, D. A., & ROSS, G. J. B. 1989. Organochlorines in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the east coast of South Africa. *South African Journal of Marine Science*, 8:207-217.
- COLBORN, T., & CLEMENT, C. (EDS.) 1992. Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. *Princeton Scientific Publishing, Princeton, N. J.*
- COLBORN, T., & SMOLEN, M. J. 1996. Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 146:91-172.
- COLBORN, T., VOM SAAL, F. S., SOTO, & A. M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101:378-384.
- CONNELL, D. W., MILLER, G. J., MORTIMER, M. R., SAHW, G. R., & ANDERSON, S. M. 1999. Persistent lipophilic contaminants and other chemical residues in the southern hemisphere. *Environmental Science. & Technology.*, 29:47-82.
- CONSENSUS STATEMENT 1995. Statement from the work session on environmental induced alterations in development: A focus on wildlife. *Environmental Health Perspectives (Suppl)*, 103(4):3-5.
- COOKE, A. S. 1973. Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants. *Environmental Pollution*, 4:85-152.
- COOKE, B. K., & STRINGER, A. 1982. Distribution and breakdown of DDT in orchard soil. *Pesticide Science*, 13:545-551.
- CORSOLINI, S., AURIGI, S., & FOCARDI, S. 2000. Presence of polychlorobiphenyls (PCBs) and coplanar congeners in the tissues of the Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Marine Pollution Bulletin*, 40(11):952-960.

- CORSOLINI, S., FOCARDI, S., KANNAN, K., TANABE, S., BORRELL, A., & TO, R. 1995.** Congener profile and toxicity assessment of polychlorinated biphenyls in dolphins, sharks and tuna collected from Italian coastal waters. *Marine Environmental Research*, 40:33-53.
- COTTAM, C., & HIGGINS, E. 1946.** DDT: its effects on fish and wildlife. *U.S. Fish and Wildlife Service Circular*, 11,14 pp.
- CRAY, C., VARELLA, R., BOSSART, G. D., & LUTZ, P. 2001.** Altered *in vitro* immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 32:436-440.
- CREWS, D., BULL, J. J., & WIBBELS, T. 1991.** Estrogen and sex-reversal in turtles: dosages producing both sexes produce few intersexes. *General and Comparative Endocrinology*, 81:357-364.
- CROSS, J. N., & HOSE, J. E. 1988.** Evidence for impaired reproduction in white croaker (*Genyonemus lineatus*) from contaminated areas off southern California. *Marine Environmental Research*, 24:185-188.
- DALE, W. E., GAINES, T. B., HAYES, W. J., JR., & PEARCE, G. W. 1963.** Poisoning by DDT: relation between clinical signs and concentration in rat brain. *Science*, 142:1475-1476.
- DE FOE, D. L., VEITH, G. D., & CARLSON, R. W. 1978.** Effects of Aroclor® 1248 and 1260 on the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35:997-1002.
- DE GUISE, S., LAGACE, A., & BÉLAND, P. 1994b.** Tumors in St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Veterinary Pathology*, 31(4):444-449.
- DELLINGER, T. 2006.** Vida no mar alto:os juvenis pelágicos das tartarugas marinhas no Atlântico. *Proceedings IX Congreso Luso-Español de Herpetología. San Sebastián*. p. 27-28
- DE LONG, R. L., GILMARTIN, W. G., & SIMPSON, J. G. 1973.** Premature births in California sea-lios: association with high organochlorine pollutant residue levels. *Science (Washington, D.C.)*, 181:1168-1170.
- DE SWART, R. L., ROSS, P. S., TIMMERMAN, H. H., VOS, H. W., REIJNDERS, P. J. H., & VOS, J. G. 1995.** Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on environmentally contaminated herring. *Clinical and Experimental Immunology*, 101:480-486.
- DE VOOGT, P., & BRINKMAN, U. A. T. 1989.** Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. pp.: 3-45 En: **KIMBROUGH, R., & JENSEN, S. (EDS.)**, Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Napthalenes, Dibenzodioxins and Related Products. *Elsevier, Amsterdam*.

**DIETZ, R., HEIDI-JORGANSEN, M. P., & HARKONEN, T. 1989.** Deaths of harbour seals in Europe. *Ambio*, 18:258-264.

**DILLON, T. M., BENSON, W. H., STACKHOUSE, R. A., & CRIDER, A. M. 1990.** Effects of selected PCB congeners on survival, growth, and reproduction in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9:1317-1326.

**DODD JR., C. K. 1988.** Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758). *United States Fish and Wildlife Service. U. S. Department of the Interior. FAO Synopsis NMFS-149. Biological Report 88(14), Washington, D.C.*

**DOMINGO, M., VISA, J., PUMAROLA, M., MARCO, A. J., FERRER, L., RABANAL, R., & KENNEDY, S. 1992.** Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, 29:1-10.

**DUFFY, J. E., CARLSON, E. A., LI, Y., PROPHETE, C., ZELIKOFF, J. T. 2003.** Age-related differences in the sensitive of the fish immune response to a coplanar PCB. *Ecotoxicology*, 12:251-259.

**DUKE, T. W., LOWE, J. I., & WILSON JR, A. J. 1970.** A polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254®) in the water, sediment, and biota of Escambia Bay, Florida. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 5:171-180.

**DURFEE, R. L., CONTOS, G., WHITERMORE, F. C., BARDEN, J. D., HACKMAN, E. E., III, & WESTIN, R. A. 1976.** PCBs in the United States-industrial use and environmental distribution. *Report N° EPA 56016-16-005, Versar, Inc., Springfield, VA.*

**EHRHART, L. M. 1991.** Fibropapillomas in green turtles of the Indian River lagoon, Florida: distribution over time and area, pp. 59-61. En: **BALAZS, G. H., & POOLEY, S. G. (EDS.):** Research Plan for Marine Turtle Fibropapilloma. *NOAA-Technical Memorandum NMFS-SWFC-156. Honolulu, Hawaii.*

**EISLER, R. 1986b.** Polychlorinated biphenyl hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic reviews. *Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior, Washington, D.C., Biological Report*, 85 (1.7). 37 pp.

**EISLER, R. 1990.** Chlordane hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Fish and Wildlife Department, U.S. Department of the Interior, Washington, D.C., Biological Report*, 85(1.21): 49 pp.

**ENGST, R., MACHOLZ, R., & KUJAWA, M. 1979.** Recent state of lindane metabolism. Part II. *Research. Review*. 72:71-95.

**EPA, ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1975.** DDT: a Reviews of scientific and economic aspects of the decision to ban its use as a pesticide. *EPA-540/1-75-022. United States Environmental Protection Agency. U.S. Public Health Service. Washington, D C.*

**EPA, ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1989.** Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. *United States Environmental Protection Agency. U.S. Public Health Service. Washington, DC.*

**EPA, ENVIRONMENT PROTECTION AUTHORITY. 1996a.** PCBs: Cancer dose-response assessment and application to environment mixtures. *NC EA-W-059 National Center for Environmental Assessment, EPA: Whashington DC.*

**EPA, ENVIRONMENT PROTECTION AUTHORITY. 1996b.** Propose guidelines for carcinogen risk assessment, notice. *Federal Register, 61(79): 17960-18011.*

**FACEMIRE, C. F., GROSS, T. S., & GUILLETTE JR., L. J. 1995.** Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture?. *Environmental Health Perspectives, 103(4):79-86.*

**FALCK, F., RICCI, A., WOLF, M.S., GODBOLD, J., & DECKERS, P. 1992.** Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Archive Environmental Health, 47:143-146.*

**FDA, FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. 1988.** Tolerances for unavoidable poisonous or deleterious substances. *21 CFR 109.30.*

**FED. REG., FEDERAL REGISTER. 1979.** Register 44, 38340, June 29.

**FEELEY, M. M. 1995.** Biomarkers for Great Lakes priority contaminants: halogenated aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives, 103(19):7-16.*

**FERNÁNDEZ, M., PADRÓN, C., MARCONI, L., GHINI, S., COLOMBO, R., SABATINI, A. G., & GIROTTI, S. 2001.** Determination of organophosphoru pesticides in honeybees after solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A, 922:257-265.*

**FERRI, V. 1999.** Introducción. pp.: 8-28. **GRIJALBO (EDS.).** *Tortugas y galápagos.*

**FERRI, V. 1999.** Mares y océanos. pp.: 40-56. **GRIJALBO (EDS.).** *Tortugas y galápagos.*

**FLEET, R. R., CLARK, D. R., & PLAPP, F. W. 1972.** Residues of DDT and dieldrin in snakes from two Texas agro-ecosystems. *BioScience, 22:664.*

**FLEET, R. R., & PLAPP, F. W. JR. 1978.** DDT residues in snakes decline since DDT ban. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 19:383-388.

**FOCARDI, S., BACCI, E., LEONZIO, C., & CRISSETIG, G. 1984.** Chlorinated hydrocarbons in marine animals from the Northern Tyrrhenian Sea (N. W. Mediterranean). *Thalassia Jugoslavica*, 20(1):37-43.

**FOCARDI, S., BARGAGLI, R., FOSSI, C., & LEONZIO, C. 1985.** Chlorinated hydrocarbons in selachii of the Tyrrhenian Sea. *Nova Thalassia*, 7:223-228.

**FOCARDI, S., FOSSI, C., LAMBERTINI, M., LEONZIO, C., & MASSI, A. 1988.** Long term monitoring of pollutants in eggs of yellow-legged herring gull from Capraia Island (Tuscan Archipelago). *Environmental Monitoring Assessment*, 10:43-50.

**FOCARDI, S., LEONZIO, C., & FOSSI, C. 1988.** Variations in polychlorinated biphenyl congener composition in eggs of Mediterranean water birds in relation to their position in the food chain. *Environmental Pollution*, 52:243-255.

**FOLMAR, L. C., DICKHOFF, W. W., ZAUGG, W. S. & HODGINS, H. O. 1982.** The effects of Aroclor 1254 and No. 2 fuel oil on smoltification and sea-water adaptation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology (Amst.)*, 2:291-299.

**FORCADA, J., AGUILAR, A., HAMMOND, P. S., PASTOR, X., & AGUILAR, R. 1994.** Distribution and numbers of striped dolphins in the western Mediterranean Sea after the 1990 epizootic outbreak. *Marine Mammal Science*, 10:137-150.

**FOSSI, M. C. 1994.** Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102(12):49-54.

**FOSSI, C., LEONZIO, C., FOCARDI, S., & RENZONI, A. 1988.** The black-headed gull's adaptation to polluted environments: the role of the mixed-function oxidase detoxification system. *Environmental Conservation*, 15(3):221-224.

**FOSSI, M. C., SAVELLI, C., MARSILI, L., CASINI, S., JIMENEZ, B., JUNIN, M., CASTELLO, H., & LORENZANI, J. A. 1997.** Skin biopsy as a non-destructive tool for the toxicological assessment of endangered populations of pinnipeds: preliminary results on mixed function oxidase in *Otaria flavescens*. *Chemosphere*, 35(8):1623-1635.

**FOWLER, M. E. 1986.** Metabolic bone disease, pp. 80-90. En: **FOWLER, M. E. (ED.):** Zoo and Wild Animal Medicine, 2<sup>nd</sup> Ed. *W. B. Saunders Company, Philadelphia*.

- FRAZIER, J. 1980.** Marine turtles and problems in coastal management, p. 2395. En: **EDGE B. L. (ED.):** *Coastal Zone '80, Vol III, Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Symposium on Coastal and Ocean Management.*
- FREEMAN, H. C., SANGALANG, G. B., & FLEMING, B. 1982.** The sublethal effects of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) diet on the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Science of the Total Environment*, 24:1-11.
- FUKUSHIMA, M., & KAWAI, S. 1981.** Variation of organochlorine residue concentration and burden in striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, with growth. pp. 97-114. En: **FUJIYAMA, T. (EDS.).** Studies on the levels of organochlorine compounds and heavy metals in the marine organisms. *University of the Ryukyus, Okinawa.*
- FULLER, G. B., & HOBSON, W. C. 1987.** Effect of PCBs on reproduction in mammals. Pp. 101-125. In: **WAID, J. S. (EDS.).** PCBs and the environment. Vol. 2. *CRC Press, Boca Raton, Fla.*
- GAGNON, M. M., & DODSON, J. J. 1990.** Congener specific analysis of the accumulation of PCB by aquatic organisms in the maximum turbidity zone of the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. pp. 739-759. En: *The science of the total environment. 97/98. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.*
- GALGANI, F., BOCQUENE, G., LUCON, M., GRZEBYK, D., LETROUT, F., & CLAISSE, D. 1991.** EROD measurements in fish from the northwest part of France. *Marine Pollution Bulletin*, 22:494-500.
- GAMACHE, N., & HORROCKS, J. 1992.** Fibropapilloma disease in green turtles, *Chelonia mydas* around Barbados, West Indies. En: **SALMON, M., & WYNEKEN, J. (EDS.).** Proc. 11<sup>th</sup> Ann. Workshop on Sea Turtle Biology & Conservation 26 February-2 March 1991, Jekyll Island, Georgia. *National Oceanic & Atmospheric Administration/National Marine Fisheries Service, January 1992. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-302.*
- GARDNER, G. R., PRUELL, R. J., & FOLMAR, L. C. 1989.** A comparison of both neoplastic and non-neoplastic disorders in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) from eight areas in New England. *Marine Environmental Research*, 28:393-397.
- GARDNER, S. C., & NICHOLS, W. J. 2001.** Assessment of sea turtle mortality rates in the Bahía Magdalena region, Baja California Sur, México. *Chelonian Conservation and Biology*, 4:197-199.
- GARDNER, S. C., PIER, M. D., WESSELMAN, R., & JUÁREZ, J. A. 2003.** Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 46:1082-1089.

**GAUTHIER, J. M., DUBEAU, H., & RASSART, E. 1999.** Induction of micronuclei in vitro by organochlorine compounds in beluga whale skin fibroblasts. *Mutation research*, 439(1):87-95.

**GEORGE, J. L., & STICKEL, W. H. 1949.** Wildlife effects of DDT dust used for tick control on a Texas prairie. *American Midland Naturalist*, 42:229-238.

**GEORGE, R. H. 1997.** Health problems and diseases of sea turtles. pp: 363-385. En: **LUTZ, P. L., MUSICK, J. A. (EDS):** The Biology of Sea Turtles. *Boca Raton, FLCRC Press*.

**GEORGE, R. H., JONES, W., & MUSICK, J. A. 1990.** Enterohepatitis due to *Entamoeba invadens* in captive *Caretta caretta*. pp: 93. En: **RICHARDSON, T. H., RICHARDSON, J. I., & DONNELLY, M. (Compilers):** *Proceedings of the 10<sup>th</sup> Annual Workshop on Sea Turtle Conservation and Biology*. NMFS Technical Memorandum NOAA-TM-NMFS-SEFSC-278, Miami, FL.

**GEORGE, R. H., WOLKE, R. E., & KEINATH, J. A. 1995.** A new reason why apparently healthy sea turtles strand in warm weather. pp: 41. En: **RICHARDSON, J. I., & RICHARDSON, T. H. (Compilers):** *Proceedings of the 12<sup>th</sup> Annual Workshop on Sea Turtle Conservation and Biology*, NMFS Technical Memorandum, NOAA-TM-NMFS-SEFSC-361, Miami, FL.

**GEPPERT, H. 1998.** Solid-phase microextraction with rotation of the microfiber. *Analytical Chemistry*, 70:3981-3982.

**GERACT JR. 1989.** Clinical investigation of the 1987-88 mass mortality of bottlenose dolphins along the US Central and South Atlantic Coast. *Final report to the National Marine Fisheries Service and U.S. Navy, Office of Naval Research and Marine Mammal Commission, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Ontario*.

**GEYER, H. J., SCHEUNERT, I., BRUGGEMANN, R., MATTHIES, M., STEINBERG, C. E. W., ZITKO, V., KETTRUP, A., & GARRISON, W. 1994.** The relevance of aquatic organisms' lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals: Toxicity of lindane to different fish species. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 28:53-70.

**GIAM, C. S., & RAY, L. E. 1987.** Pollutant studies in marine animals. *CRC Press, Florida, 187 D*.

**GIBBONS, J. W., SCOTT, D. E., RYAN, T. J., BUHLMANN, K. A., TUBERVILLE, T. D., METTS, B. S., GREENE, J. L., MILLS, T., LEIDEN, Y., POPPY, S., & WINNE, C. T. 2000.** The global decline of reptiles, *déjà vu amphibians*. *Bioscience*, 50:653-666.

- GILBERTSON, M. 1989.** Effects on fish and wildlife populations. pp. 103-127. En: **KIMBROUGH, R. D., & JENSEN, A. A. (EDS.)**. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins, and related products. *Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam*.
- GILBERTSON, M., KUBIAK, T., LUDWIG, J., & FOX, G. 1991.** Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 33(4):455-520.
- GINGELL, R., & WALLCAVE, L. 1974.** Species differences in the acute toxicity and tissue distribution of DDT in mice and hamsters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 28:385-394.
- GIOURANOVITS-PSYLLIDOU, R., GEORGAKOPOULOS-GREGORIADES, E., & VASSILOPOULOU, V. 1994.** Monitoring of organochlorine residues in red mullet (*Mullus barbatus*) from Greek waters. *Marine Pollution Bulletin*, 28(2):121-123.
- GLADEN, B.C., & ROGAN, W. J. 1991.** Effects of perinatal polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene on later development. *Journal of Pediatric*, 119:58-63.
- GLADEN, B.C., ROGAN, W. J., HARDY, P., THULLEN, J., TINGESLSTAD, J., TULLY, M. 1988.** Development after exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene transplacentally through human milk. *Journal of Pediatric*, 113:991-995.
- GLAZEBROOK, J. S., & CAMPBELL, R. S. F. 1990a.** A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9: 83-95.
- GLAZEBROOK, J. S., & CAMPBELL, R. S. F. 1990b.** A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. II. Oceanarium-reared and wild turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9: 97-104.
- GLAZEBROOK, J. S., CAMPBELL, R. S. F., & THOMAS, A. T. 1993.** Studies on an ulcerative stomatitis – obstructive rhinitis – pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16: 133-147.
- GODLEY, B. J., GAYWOOD, M. J., LAW, R. J., MCCARTHY, C. J., MCKENZIE, C., PATTERSON, I. A. P., PENROSE, R., REID, R. J., & ROSS, H. M. 1998.** Patterns of marine turtle mortality in British waters (1992-1996) with reference to tissue contaminant levels. *Journal of the Marine Biological Association, UK*, 78:973-984.
- GODLEY, B. J., SMITH, S. M., CLARK, P. F., & TAYLOR, J. D. 1997.** Molluscan and crustacean items in the diet of the loggerhead turtle, *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) [Testudines: Cheloniidae] in the eastern Mediterranean. *Journal of Molluscan Studies*, 63:474-476.



**GOLDMAN, D., & YAWETZ, A. 1991.** Cytochrome P-450 mediated metabolism of progesterone by adrenal microsomes of PCB-treated and untreated barn owl (*Tyto alba*) and marsh turtle (*Mauremys caspica*) in comparison with the guinea-pig. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99C:251-255.

**GORDON, A. N., KELLY, W. R., & LESTER, J. G. 1993.** Epizootic mortality of free-living green turtles, *Chelonia mydas*, due to coccidiosis. *Journal of Wildlife Diseases*, 29 (3): 490-494.

**GORDON, A. N., POPLE, A. R., NG, J. 1998.** Trace metal concentrations in livers and kidneys of sea turtles from south-eastern Queensland, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 49:409-414.

**GRACZYK, T. K., BALAZS, G. H., WORK, T., AGUIRRE, A. A., ELLIS, D. M., MURAKAWA, S. K. K., & MORRIS, R. 1997.** *Cryptosporidium* sp. infections in green turtles, *Chelonia mydas*, as a potential source of marine waterborne oocysts in the Hawaiian Islands. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7): 2925-2927.

**GRAMENTZ, D. 1988.** Involvement of loggerhead turtle with the plastic, metal, and hydrocarbon pollution in the central Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 19:11-13.

**GRASMAN, K. A., FOX, G. A., SCANLON, P. F., & LUDWIG, J. P. 1996.** Organochlorine-associated immunosuppression in pre fledgling Caspian terns and herring gulls from the Great Lakes: an ecoepidemiological study. *Environmental Health Perspectives*, 104(4):829-842.

**GREIM, H., & REMMER, H. 1966.** Die wirkung von DDT und phenobarbital auf mikrosomale hydroxylierende cytochrome. *Pharmacology and Experimental Pathology*, 225:16-17.

**GROSS, W. B., & SEIGEL, H. S. 1983.** Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, 27:972-979.

**GUILLETTE JR., L. J. 1993.** Statement of Louis J. Guillette Jr. 1994. En: Health Effects of Strogenic Pesticides. *Hearing before the Subcommittee on Health and the Environment of the Committee on Energy and Commerce House of Representatives. 103 Congress, 1<sup>st</sup> Session. Serial N° 103-87. Washington, DC:U.S. Government Printing Office,42-49.*

**GUILLETTE JR., L. J., CRAIN, D. A., ROONEY, A. A. & PICKFORD, D. B. 1995.** Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 103(6):157-164.

**GUILLETTE JR., L. J., GROSS, T. S., MASSON, G. R., MATTER, J. M., PERCIVAL, H. F., & WOODWARD, A. R. 1994.** Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone

concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives*, 102:680-688.

**HAAKE, J. M., SAFE, S., MAYURA, K., & PHILLIPS, T. D. 1987.** Aroclor 1254 as an antagonist of the teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology Letters*, 38(3):299-306.

**HACKING, M. A., BUDD, J., & HODSON, K. 1977.** The ultrastructure of the liver of the rainbow trout: normal structure and modifications after chronic administration of a polychlorinated biphenyl Aroclor 1254. *Canadian Journal of Zoology*, 56:477-491.

**HAINES, H. 1978.** A herpesvirus disease of green sea turtles in aquaculture. *Marine Fisheries Review Paper*, 1294: 33-37.

**HAINES, H., & KLEESE, W. C. 1977.** Effect of water temperature on a herpesvirus infection of sea turtles. *Infection and Immunity*, 15 (3): 756-759.

**HALE, R. C. 1988.** Disposition of polycyclic aromatic compounds in blue crabs, *Callinectes sapidus*, from the southern Chesapeake Bay. *Estuaries*, 11:255-263.

**HALL, R. J., KAISER, T. E., ROBERTSON JR., W. B., & PATTY, P. C. 1979.** Organochlorine residues in eggs of the endangered American crocodile (*Crocodylus acutus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 23:87-90.

**HANSEN, L. G. 1987.** Environmental toxicity of polychlorinated biphenyls. pp. 15-48. En: **SAFE, S., & HUTZINGER, O. (EDS.)**. Environmental toxin series I. *Springer-Verlag, Berlin*.

**HARMS, C., LEWBART, G., BEASLEY, J., STAMPER, A., CHITTICK, B., & TROGDON, M. 2002.** Clinical implications of hematology and plasma biochemistry values for loggerhead sea turtles undergoing rehabilitation. pp.:190-191. En: *Proceedings of the Twentieth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation (Mosier A., Foley, A., Brost, B., compilers), 29 February-4 March 2000, Orlando, FL. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-477. Miami: U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, Southeast Fisheries Science Center of the National Marine Fisheries Service.*

**HARVELL, C. D., KIM, K., BURKHOLDER, J. M., COLWELL, R. R., EPSTEIN, P. R., GRIMES, D. J., HOFMANN, E. E., LIPP E. K., OSTERHAUS, A. D. M. E., OVERSTREET, R. M., PORTER, J. W., SMITH, G. W., & VASTA, G. R. 1999.** Emerging marine diseases - Climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285:1505-1510.

**HATTULA, M. L., & KARLOG, O. 1972.** Toxicity of PCB to goldfish. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 31:238-240.

**HAWKER, D. W., & CONNELL, D. W. 1988.** Octanol-water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. *Environmental Science & Technology*, 22:382-387.

**HAYES, JR. W. J. 1965.** Reviews of the metabolism of chlorinated hydrocarbon insecticides especially in mammals. *Annual Review of Pharmacology*, 5:27-51.

**HAYES, JR. W. J. 1982.** Pesticides studied in man. **WILLIAMS & WILKINS (EDS.)**: Baltimore, Maryland, 672p.

**HAYES, JR. W. J. 1991.** Introduction. pp. 1-37. En: **HAYES JR., W. J., & LAWS JR., E. R. (EDS.)**. Handbook of pesticide toxicology. *Academic Press, San Diego*.

**HEBERT, C. E., GLOOSCHENKO, V., HAFFNER, G. D., & LAZAR, R. 1993.** Organic contaminants in snapping turtle (*Chelydra serpentina*) populations from southern Ontario, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24:35-43.

**HEINZ, G. H., PERCIVAL, H. F., & JENNINGS, M. L. 1991.** Contaminants in American alligator eggs from Lake Apopka, Lake Griffin, and Lake Okeechobee, Florida. *Environmental Monitoring & Assessment*, 16:277-285.

**HELLE, H., OLSSON, M., & JENSEN, S. 1976a.** DDT and PCB levels and reproduction in ringed seal from the Bothnian Bay. *Ambio*, 5:188-189.

**HENDERSON, G. L., & WOOLLEY, D. E. 1969.** Studies on the relative insensitivity of the immature rat to the neurotoxic effects of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethane (DDT). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 170:173-180.

**HENDRICKS, J. D., SCOTT, W. T., PUTNAM, T. P., & SINNHUBER, R. O. 1981.** Enhancement of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) embryos by prior exposure of gravid females to dietary Aroclor 1254. pp. 203-214. En: **BRANSON, D. R., & DICKSON, K. L. (EDS.)**. Aquatic toxicology and hazard assessment: fourth conference. ASTM STP 737. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.*

**HENNY, C. J., & HERRON, G. B. 1989.** DDE, selenium, mercury, and white-faced ibis reproduction at Carson Lake, Nevada. *J Wildl Manag*, 53:1032-1045.

- HERBERT, C. E., GLOOSCHENKO, V., HAFFNER, G. D., LAZAR, R. 1993.** Organic contaminants in snapping turtle (*Chelydra serpentina*) populations from southern Ontario, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24:35-43.
- HERBST, L. H. 1994.** Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annual Review of Fish Diseases*, 4: 389-425.
- HERBST, L. H., JACOBSON, E. R., MORETTI, R., BROWN, T., SUNDBERG, J. P., & KLEIN, P. A. 1995.** Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22: 1-12.
- HERBST, L. H., & KLEIN, P. A. 1995.** Green turtle fibropapillomatosis: Challenges to assessing the role of environmental cofactors. *Environmental Health Perspectives*, 103(4):27-30.
- HERBST, L. H., MORETTI, R., BROWN, T., & KLEIN, P. A. 1996.** Sensitivity of the transmissible green turtle fibropapillomatosis agent to chloroform and ultracentrifugation conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25: 225-228.
- HILLESTAD, H. O., REIMHOLD, R. J., STICKENT, R. R., WINDOM, H. L., & JENKINS, A. H. 1974.** Pesticides, heavy metals, and radionuclide uptake in Loggerhead sea turtles from Georgia and South Carolina. *Herpetological Reviews*, 5:75.
- HIRAIZUMI, Y., TAKAHASHI, M., & NISHIMURA, H. 1979.** Adsorption of polychlorinated biphenyl onto sea bed sediment, marine plankton, and other adsorbing agents. *Environmental Science & Technology*, 13:580-583.
- HOLDEN, A. V., & MARSDEN, K. 1967.** Organochlorine pesticides in seals and porpoises. *Nature*, 216:1274-1276.
- HOMER, B. L., JACOBSON, E. R., SCHUMACHER, J., & SCHERBA, G. 1994.** Chlamydiosis in Mariculture-reared Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology*, 31: 1-7.
- HOPKINS, W. A. 2000.** Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:2391-2393.
- HOPKINS, W. A., ROWE, C. L., & CONGDON, J. D. 1999.** Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snakes, *Nerodia fasciata*, exposed to coal combustion wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(6):1258-1263
- HOTCHKISS, N., & POUGH, R. H. 1946.** Effect on forest birds of DDT used for gypsy moth control in Pennsylvania. *Journal of Wildlife Management*, 10: 202-207.

**HUGHES, K. D., WESELOH, D. V., & BRAUME, B. M. 1998.** The ratio of DDE to PCB concentrations in Great Lakes herring gull eggs and its use in interpreting contaminants data. *Journal of Great Lakes Research*, 24(1):12-31.

**HUMPHREY, H. E. B. 1988.** Chemical contaminants in the Great Lakes: the human health aspect. pp. 153-156. En: **EVANS, M. S. (EDS.)**. Toxics contaminants and ecosystem health: a Great Lakes focus. Wiley, New York.

**HUTCHINSON, L., & SIMMONDS, M. 1991.** A review of the effects of pollution on marine turtles. A *Greenpeace Ecotoxicology Project London*. Greenpeace International, pp 27.

**HUTCHINSON, L., & SIMMONDS, M. 1992.** Escalation of threats to marine turtles. *Oryx*, 26:95-102.

**HUTZINGER, O., SAFE, S., & ZITKO, V. 1974.** The chemistry of PCBs. *CRC Press, Cleveland, Oh.* pp 269.

**IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1987.** Some anti-thyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenesis Risk to Humans. Supplement 7: Update of IARC Monographs, volumes 1-42.* Lyon, France:WHO.

**IUCN, INTERNATIONAL UNION FOR THE CONSERVATION OF NATURE. 2006.** Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

**IWATA, H., TANABE, S., SAKAI, N., NISHIMURA, A. & TATSUKAWA, R. 1994.** Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water and sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes. *Environmental Pollution*, 85:15-33.

**IWATA, H., TANABE, S., SAKAI, N., & TATSUKAWA, R. 1993.** Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environmental Science & Technology*, 27:1080-1098.

**JACOBSON, E. R., BUERGELT, C., WILLIAMS, B., & HARRIS, R. H. 1991.** Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green sea turtle *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12: 1-6.

**JACOBSON, S.W., FEIN, G.G., JACOBSON, J. L. 1985.** The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Development*, 56:856-860.

**JACOBSON, E. R., GASKIN, J. M., ROELKE, M., GREINER, E. C., & ALLEN, J. 1986.** Conjunctivitis, tracheitis, and pneumonia associated with herpesvirus infection in green sea turtles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189 (9): 1020-1023.

- JACOBSON, E. R., GASKIN, J. M., SHIELDS, R. P., & WHITE, R. H. 1979. Mycotic Pneumonia in Mariculture-Reared green Sea Turtles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175: 929-932.
- JACOBSON, E. R., MANSELL, J. L., SUNDBERG, J. P., HAJJAR, L., REICHMANN, M. E., EHRHART, L. M., WALSH, M., & MURRU, F. 1989. Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Journal of Comparative Pathology*, 101: 39-52.
- JACOBSON, J. L., & JACOBSON, S.W. 1993. A four-year followup study of children born to consumers of Lake Michigan fish. *Journal of Great Lakes Research*, 19:776-783.
- JACOBSON, J. L., JACOBSON, S.W., & HUMPHREY, H. E. B. 1990a. Effects of *in utero* exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *Journal of Pediatric*, 116:38-45.
- JANICKI, R. H., & KINTER, W. B. 1971. DDT: disrupted osmoregulatory events in the intestine of the *Anguilla rostrata* adapted to seawater. *Science*, 173(2):1146-1148.
- JANICKI, R. H., & KINTER, W. B. 1971. DDT inhibits Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase in the intestinal mucosae and gills of marine teleosts. *Nature New Biology*, 233(39):148-149.
- JANSEN, H. T., COOKE, P. S., PORCELLI, J., LIU, T-C., & HANSEN, L. G. 1993. Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproductive Toxicology*, 7:237-248.
- JENSEN, S. 1966. Report of a new chemical hazard. *New Scientist*, 32:612.
- JENSEN, S. 1972. The PCB story. *Amnio*, 1:123-131.
- JENSEN, S., JANSSON, B., & OLSSON, M. 1979. Number and identity of anthropogenic substances known to be present in Baltic seals and their possible effects on reproduction. *Annals of the New York Academic of Sciences*, 320:436-448.
- JOBLING, S., REYNOLDS, T., WHITE, R., PARKER, M. G., & SUMPTER, J. P. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect*, 103:582-587.
- JUCHAU, M. R. 1983. Disposition of chemical contaminants in maternal-embryonic/fetal systems. pp. 95-132. En: Hazard Assessment of Chemicals. Current Developments. Vol. 2. *Academic Press, New York*.

**KAMMANN, U., KNICKMEYER, R., & STEINHART, H. 1990.** Distribution of polychlorobiphenyls and hexachlorobenzene in different tissues of the dab (*Limanda limanda L.*) in relation to lipid polarity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45:552-559.

**KAMRIN, M. A., & RINGER, R. K. 1996.** Toxicological Implications of PCB Residues in Mammals. pp:153-165. En: **BEYER, W. N., HEINZ, G. H., & REDMON-NORWOOD, A. W. (EDS.).** Environmental Contaminants in Wildlife. Interpreting Tissue Concentrations. Cap. 5. *CRC. Lewis Publishers. Boca Raton, New York, London, Tokio.*

**KANNAN, K., TANABE, S., BORRELL, A., AGUILAR, A., FOCARDI, S., & TATSUKAWA, R. 1993c.** Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in striped dolphins affected by an epizootic in the western Mediterranean Sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25:227-233.

**KANNAN, K., UEDA, M., SHELBY, J. A., MENDOCA, M. T., KAWANO, M., MATSUDA, M., WAKIMOTO, T., GIESY, J. P. 2000.** Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCBs), and organochlorine pesticides in yellow-blotched map turtle from the Pascagoula River basin, Mississippi, USA. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 38:362-370.

**KARAKAYA, A. E., & OZLAP, S. 1987.** Organochlorine pesticides in human adipose tissue collected in Ankara (Turkey) 1984-1985. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38:941-945.

**KAVLOCK, R. J., DASTON, G. P., DE ROSA, C., FENNER-CRISP, P., GRAY, L. E., KAATTARI, S., LUCIER, G., LUSTER, M., MAC, M. J., MACZKA, C., MILLER, R., MOORE, J., ROLLAND, R., SCOTT, G., SHEEHAN, D. M., SINKS, T., & TILSON, H. A. 1996.** Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop *Environmental Health Perspectives*, 104(4):715-740.

**KAWANO, M., MATSUSHITA, S., INOUE, T., TANAKA, H., & TATSUKAWA, R. 1986.** Biological accumulation of chlordane compounds in marine organisms from the northern North Pacific and Bering Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 17:512-516.

**KEIL, J. E., PRIESTER, L. E., & SANDIFER, S. H. 1971.** Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1242®): effects of uptake on growth, nucleic acids, and chlorophyll of a marine diatom. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 6:156-159.

**KEINATH, J. A., MUSICK, J. A., & BYLES, R. A. 1987.** Aspects of the biology of Virginia's sea turtles: 1979-1986. *Virginia Journal of Science*, 38:329-336.

- KELLER, J. M., KUCKLICK, J. R., HARMS, C.A., & MCCLELLAN-GREEN, P. 2004.** Organochlorine contaminants in sea turtles: correlations between whole blood and fat. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:726-738.
- KELLER, J. M., KUCKLICK, J. R., PEDEN-ADAMS, M. M., STAMPER, M. A., & MCCLELLAN-GREEN, P. 2002.** Correlations between organochlorine contaminants and health indicators in loggerhead sea turtles (Abstract). En: Proceeding of SETAC 23<sup>rd</sup> Annual Meeting in North America, 16-23 November 2002, Salt Lake City, UT. Pensacola, FL: *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, 176.
- KENNEDY, S. 1999.** Contaminants and morbilliviral epizootics in marine mammals. *Journal of Cetacean Research and Management*, (special issue 1):267-273.
- KEY, T., REEVES, G. 1994.** Organochlorides in the environment and breast cancer. *British Medical Journal*, 308:1520-1521.
- KEYS, B., HLAVINKA, M., MASON, G., & SAFE, S. 1985.** Modulation of rat hepatic microsomal testosterone hydroxylases by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related toxic isostereomers. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 63:1537-1542.
- KHOLKUTE, S. D., & DUKELOW, W. R. 1997.** Effects of polychlorinated biphenyl (PCB) mixtures on *in vitro* fertilization in the mouse. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59(4):531-536.
- KING, R. 1986.** Population ecology of the Lake Eric water snake, *Nerodia sipedon insularum*. *Copeia*, 3:757-772.
- KING, R. 1993.** Microgeographic, historical, and size-correlated variation in water snake diet composition. *Journal of Herpetology*, 27:90-94.
- KINNE, O. 1985.** Introduction: Reptilia, Aves, Mammalia, pp. 543-552. En: **KINNE, O. (ED.):** Diseases of Marine Animals, Vol. IV, Part 2, *Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg*.
- KLEIMAN, C. F. 1997.** Preocupación sobre la salud pública acerca de los bifenilos policlorados (PCB) en el ambiente. *American Council on Science and Health (ACSH) y la Fundación Argentina de Ecología Científica (FAEC). Actualización del informe de 1991 de FLYNN, L. T. Ph.D., M.B.A.*
- KLOTZ, A. V., STEGMANN, J. J., & WALSH, C. 1983.** An aryl hydrocarbon hydroxylating hepatic cytochrome P-450 from the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226:578-592.



- KOCH, R. B., DESAIAH, D., YAP, H. H., & CUTKOMP, L. K. 1972.** Polychlorinated biphenyls: Effect of long-term exposure on ATPase activity in fish, *Pimephales promelas*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 7(2-3): 87-92.
- KODAVANTI, P. R., & TILSON, H. A. 1997.** Structure-activity relationships of potentially neurotoxic PCB congeners in the rat. *Neurotoxicology*, 18:425-442.
- KOEMAN, J. H., DEN BOER, W. M. J., FEITH, A. F., DE LONGH, H. H., & SPLIETHOFF, P. C. 1978.** Three years observation on side effects of helicopter applications of insecticides used to exterminate *Glossina* species in Nigeria. *Environmental Pollution*, 15:31-59.
- KÖHLER, A. 1990.** Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) caught at differently polluted estuaries. *Aquatic Toxicology (Amst.)*, 16:271-294.
- KORACH, K. S., SARVER, P., CHAE, K., MCLACHLAN, J. A., & MCKINNEY, J. D. 1988.** Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Molecular Pharmacology*, 33:120-126.
- KRISHNAN, V., SAFE, S. 1993.** Polychlorinated biphenyls (PCB), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 120:55-61.
- KUBIAK, T. J., HARRIS, H. J., SMITH, L. M., SCHWARTZ, T. P., STALLING, D. L., TRICK, J. A., SILEO, L., DOCHERTY, D. E., & ERDMAN, T. C. 1989.** Microcontaminants and reproductive impairment of the Foster's tern on Green Bay, Lake Michigan-1983. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18:706-727.
- KUEHL, D. W., & HAEBLER, R. 1995.** Organochlorine, organobromine, metal, and selenium residues in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) collected during an unusual mortality event in the Gulf of Mexico, 1990. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28:494-499.
- KUEHL, D. W., HAEBLER, R., & POTTER, C. 1991.** Chemical residues in dolphins from the U.S. Atlantic coast including Atlantic bottlenose obtained during the 1987/88 mass mortality. *Chemosphere*, 22:1071-1084.
- KUTZ, W. F., PATRICIA, H. W., & DAVID, P. B. 1991.** Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 120:1-82.

- KWAN, D. 1994.** Fat reserves and reproduction in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Wildlife Research*, 21:257-266.
- LAKE, J. L., HAEBLER, R., MCKINNEY, R., LAKE, C. A., & SADOVE, S. S. 1994.** PCBs and other chlorinated organic contaminants in tissues of juvenile Kemp's Ridleys turtles (*Lepidochelys kempi*). *Marine Environmental Research*, 38:313-327.
- LARSSON, P., COLLVIN, L., OKLA, L., & MEYER, G. 1992.** Lake productivity and water chemistry as governors of the uptake of persistent pollutants in fish. *Environmental Science & Technology*, 26:346-352.
- LARSSON, P., OKLA, L., RYDING, S.-O., & WESTÖÖ, B. 1990.** Contaminated sediment as a source of PCBs in a river system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47:746-754.
- LEIBOVITZ, L., REBELL, G., & BOUCHER, G. C. 1978.** *Caryospora chelonidae*: a coccidial pathogen of mariculture-reared green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Journal of Wildlife Diseases*, 14: 269-275.
- LETCHER, R. J., NORSTROM, R. J., & BERGMAN, A. 1995.** Geographical distribution and identification of methyl sulfone PCB and DDE metabolites in pooled polar bear (*Ursus maritimus*) adipose tissue from western hemisphere Arctic and sub-Arctic regions. *Science of Total Environment*, 161:409-420.
- LI, W., WU, W. Z., SCHRAMM, K. W., XU, Y., & KETTRUB, A. 1999.** Toxicity of Mixtures of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, Dibenzofurans, and Biphenyls Determined by Dose-Response Curve Analysis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62:539-546.
- LICHTENFELS, J. R., BIER, J. W., & MADDEN, P. A. 1978.** Larval anisakid (*Sulcascaris*) nematodes from Atlantic molluscs with marine turtles as definitive hosts. *Transactions of the American Microscopical Society*, 97(2): 199-207.
- LIEB, A. J., BILLS, D. D., & SINNHUBER, R. O. 1974.** Accumulation of dietary polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22:638-642.
- LIZANA, M., & BARBADILLO, L. J. 1997.** Legislación, protección y estado de conservación de los anfibios y reptiles españoles, pp. 477-516. En: **PLEGUEZUELOS, J. M. (ED.):** Distribución y Biogeografía de los Anfibios y Reptiles en España y Portugal. *Universidad de Granada*.
- LOCKYER, C., & BROWN, S. G. 1981.** The migration of whales. pp. 105-137. En: **AIDLEY, D. J. (EDS.)**. Society for experimental biology seminar series. 13. Animal migration. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*.

- LÓPEZ-JURADO, L. F., & GONZÁLEZ, S. 1983.** Las tortugas en Canarias. *Aguayro*, 147: 29-31.
- LUCKÉ, B. 1938.** Studies on tumors in cold-blooded vertebrates. *Annual Reports of the Tortugas Laboratory, Carnegie Institute of Washington*, 38: 92-94.
- LUTCAVAGE, M., LUTZ, P. L., BOSSART, G., & HUDSON, D. 1995.** Physiologic and clinicopathologic effects of crude oil on loggerhead sea turtles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28: 417-422.
- LUTCAVAGE, M., & MUSICK, J. A. 1985.** Aspects of the biology of sea turtles in Virginia. *Copeia*, 1985:449-456.
- LUTZ, P. L., & DUNBAR-COOPER, A. 1987.** Variations in the blood chemistry of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Fishery Bulletin*, 85:37-43.
- LUTZ, P. L., LUTCAVAGE, M., & HUDSON, D. 1986.** Physiological effects, pp. 93-131. *En: VARGO, S., LUTZ, P. L., ODELL, D. K., VANVLEET, T., & BOSSART, G. (EDS.): Final Report. Study of the Effect of Oil on Marine Turtles. Minerals Management Service Contract Number 14-12-0001-30063, Florida Institute of Oceanography, St. Petersburg, FL.*
- LUTZ, P. L., & MUSICK, J. A. 1997.** The Biology of Sea Turtles. *CRC Press, Boca Raton*, 432 pp.
- LUXON, P. L., HODSON, P. V., & BORGMANN, U. 1987.** Hepatic aryl hydroxylase activity of lake trout (*Salvelinus namaycush*) as a indicator of organic pollution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6:649-657.
- MANN, T. M. 1978.** Impact of developed coastline on nesting and hatchling sea turtle in Southeastern Florida. *Florida Marine Research Publication*, 33: 53-55.
- MARINE MAMMAL COMMISSION. 1999.** Marine mammals and persistent ocean contaminants: Proceedings of the Marine Mammal Commission Workshop, Keystone, Colorado. *12-15 October 1998, Bethesda, MD*, pp. 6-16,87-92.
- MARTINEAU, D., BELAND, P., DESJARDINS, C., & LEGACE, A. 1987.** Levels of organochlorine chemicals in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 16:137-147.
- MATEO, J. A., ANDREU, A. C., & LÓPEZ-JURADO, L. F. 1997.** Las tortugas marinas de la Península Ibérica, Baleares, Azores, Madeira y Canarias: Introducción. pp: 433-434. *En: PLEGUEZUELOS, J. M.*

(ED.): Distribución y Biogeografía de los Anfibios y Reptiles en España y Portugal. *Universidad de Granada*.

MATSUMURA, F. 1977. Absorption, accumulation, and elimination of pesticides by aquatic organism. En: Pesticides in Aquatic Environments (Khan MAQ, ed). *New York: Plenum Press*, 77-105.

MATSUMURA, F., BRATKOWSKI, T. A., & PATIL, K. C. 1969. DDT: Inhibition of an ATP-ase in the rat brain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 4:262-270.

MATTHEWS, H. B., SURLES, J. R., CARVER, J. G., & ANDERSON, M. W. 1984. Halogenated biphenyl transport by blood components. *Fundamental and Applied Toxicology*, 4:420-428.

MAUCK, W. L., MEHRLE, P. M., & MAYER, F. L. 1978. Effects of the polychlorinated biphenyl Aroclor® 1254 on growth, survival, and bone development in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35:1084-1088.

MAYER, F. J., MEHRLE, P. M., & SANDERS, H. O. 1977. Residue dynamics and biological effects of polychlorinated biphenyls in aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 5:501-511.

MAYER, K. S., MAYER, F. L., & WITT JR., A. 1985. Waste transformer oil and PCB toxicity to rainbow trout. *Trans Am Fish Soc*, 114:869-886.

MCCAIN A, B. B., CHAN, S.-L., KRAHN, M. M., BROWN, D. W., MYERS, M. S., LANDAHL, J. T., PIERCE, S., CLARK JR., R. C., & VARANASI, U. 1992. Chemical contamination and associated fish diseases in San Diego Bay. *Environmental Science & Technology*, 26:725-733.

MCCONNELL, E. E. 1985. Comparative toxicity of PCBs and related compounds in various species of animals. *Environmental Health Perspectives*, 60:29-33.

MCFARLAND, V. A., & CLARKE, J. U. 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environmental Health Perspectives*, 81:225-239.

MCFARLAND, V. A., & CLARKE, J. U., & GIBSON, A. 1986. Changing concepts and improved methods for evaluating the importance of PCB as dredged sediment contaminants. *Miscellaneous PaperD-86-5, U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station, Vicksburg, MS*.

- MCKENZIE, C., GODLEY, B. J., FURNESS, R. W., & WELLS, D. E. 1999.** Concentrations and patterns of organochlorine contaminants in marine turtles from Mediterranean and Atlantic waters. *Marine Environmental Research*, 47:117-135.
- MCKENZIE, C., ROGAN, E., REID, R. J., & WELLS, D. E. 1997.** Concentrations and patterns of organic contaminants in Atlantic white sided dolphins (*Lagenorhynchus acutus*) from Irish and Scottish waters. *Environmental Pollution*, 98:15-27.
- MCKIM JR., J. M., & JOHNSTON, K. L. 1983.** Polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE in loggerhead and postyearling Atlantic sea turtles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 31:53-60.
- MCKINNEY, J. D., KORACH, K. S., & MCLACHLAN, J. A. 1990.** Detoxification of polychlorinated biphenyls. *Lancet*, 335:222-223.
- MEEKS, R. L. 1968.** The accumulation of <sup>35</sup>Cl ring-labeled DDT in a fresh water marsh. *J Wildl Mgt*, 32:376-398.
- MEYERS-SCHÖNE, L., & WALTON, B. T. 1994.** Turtles as monitors of chemicals contaminants in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 135:93-153.
- MINEAU, P. 1982.** Levels of major organochlorine contaminants in sequentially-laid herring gull eggs. *Chemosphere*, 11:7679-7685.
- MINH, T.B., WATANABE, M., NAKATA, H., TANABE, S., & JEFFERSON, T. A. 1999.** Contamination by Persistent Organochlorines in Small Cetaceans from Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 39:383-392.
- MIX, M. C. 1986.** Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical literature Reviews. *Marine Environmental Research Res*, 20:1-141.
- MÖLLER, H. 1990.** Asociation between diseases of flounder (*Platichthys flesus*) and environmental conditions in the Elbe estuary, FRG. *J Cons Int Explor Mer*, 46:187-199.
- MONOD, G. 1985.** Egg mortality of Lake Geneva charr (*Salvelinus alpinus* L.) contaminated by PCB and DDT derivates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 35:531-536.
- MOORE, M. R., VETTER, W., GAUS, C., SHAW, G. R., & MÜLLER, J. F. 2002.** Trace organic compounds in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 45:62-68.
- MOORE, S. A., JR., & HARRISS, R. C. 1972.** Effects of polychlorinated biphenyl on marine phytoplankton communities. *Nature (Lond.)*, 240:356-358.

- MORI, T., & NAGASAWA, H. 1988. Toxicity of hormones in perinatal life. *CRC Press, Boca Raton, FL*.
- MORIARTY, F. 1984. Persistent contaminants, compartmental models and concentration along food-chains. *Ecology Bulletin*, 36:35-45.
- MOTHERSHEAD, R. F., HALE II, R. C., & GREAVES, J. 1991. Xenobiotic compounds in blue crabs from a highly contaminated urban subestuary. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10:1341-1349.
- MUIR, D. C. G., BRAUNE, B., DEMARCH, B., NORSTROM, R. J., WAGEMANN, R., LOCKHART, L., HARGRAVE, B. T., BRIGHT, D., ADDISON, R., PAYNE, J., & REIMER, K. 1999. Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian Arctic marine ecosystem: a review. *Science of the Total Environment*, 230:83-144.
- MUIR, D. C. G., NORSTROM, R. J., & SIMON, M. 1988. Organochlorine contaminants in Arctic marine food chain: accumulation of specific polychlorinated biphenyls and chlordane-related compounds. *Environmental Science and Technology*, 22:1071-1079.
- MUIR, D. C. G., WAGEMANN, R., HARGRAVE, B. T., THOMAS, D. J., PEAKALL, D. B., & NORSTROM, R. J. 1992. Arctic marine ecosystem contamination. *Science of the Total Environment*, 122:75-134.
- MUNSON, A. E., WHITE, JR. K. L., BARNES, D. W., MUSGROVE, D. L., LYSY, H. H., & HOLSAPPLE, M. P. 1988. An immunotoxicological evaluation of 4,4'-thiobis-(6-t-butyl-m-cresol) in female B6C3F1 mice. 1. Body and organ weights, hematology, serum chemistries, bone marrow cellularity, and hepatic microsomal parameters. *Fundamental and Applied Toxicology*, 10(4):691-700.
- MUSICK, J. A., & LIMPUS, C. J. 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. pp. 137-163. En: LUTZ, P. L., & MUSICK, J. A. (EDS.). *The biology of sea turtles. Boca Raton: CRC Press*.
- NARAHASHI, T. 1987. Nerve membrane ion channels as the target site of environmental toxicants. *Environ Health Perspect*, 71:25-29.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1990. Decline of the Sea Turtles: Causes and Prevention. *National Academy Press, Washington, D. C.* 259 pp.
- NEBEKER, A. V., & PUGLISI, F. A. 1974. Effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) on survival and reproduction of *Daphnia*, *Gammarus*, and *Tanytarus*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103:722-728.

**NEBEKER, A. V., PUGLISI, F. A., & DEFOE, D. L. 1974.** Effect of polychlorinated biphenyl compounds on survival and reproduction of the fathead minnow and flagfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103:562-568.

**NIMI, A. J. 1990.** Reviews of biochemical methods and other indicators to assess fish health in aquatic ecosystems containing toxic chemicals. *Journal of Great Lakes Research*, 16:529-541.

**NIMI, A. J. 1994.** PCBs, PCDDs, and PCDFs. pp.204-243. In: CALOW, P. (EDS.). Handbook of ecotoxicology. Vol.2. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*.

**NIMI, A. J. 1996.** PCBs in Aquatic Organisms. pp.: 117-153. En: **BEYER, W. N., HEINZ, G. H., & REDMON-NORWOOD, A. W. (EDS.).** Environmental Contaminants in Wildlife. Interpreting Tissue Concentrations. Cap. 5. *CRC. Lewis Publishers. Boca Ratón, New York, London, Tokio*.

**NIMI, A. J., & OLIVER, B. G. 1989a.** Distribution of polychlorinated biphenyl congeners and other halocarbons in whole fish and muscle among Lake Ontario salmonids. *Environmental Science & Technology*, 23:83-88.

**NIMI, A. J., & OLIVER, B. G. 1989b.** Assessment of relative toxicity of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in Lake Ontario salmonids to mammalian systems using toxic equivalent factors (TEFs). *Chemosphere*, 18:1413-1423.

**NIMMO, D. R., FORESTER, J., HEITMULLER, P. T., & COOK, G. H. 1974.** Accumulation of Aroclor® 1254 in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) in laboratory and field exposures. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11:303-308.

**NIMMO, D. R., HANSEN, D. J., COUCH, J. A., COOLEY, N. R., PARRISH, P. R., & LOWE, J. I. 1975.** Toxicity of Aroclor® 1254 and its physiological activity in several estuarine organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 3:22-39.

**NISBET, I. C. T. 1982.** Eggshell characteristics and organochlorine residues in common terns: Variation with egg sequence. *Colonial Waterbirds*, 5:139-143.

**NORBACK, D. H., & ALLEN, J. R. 1972.** Chlorinated aromatic hydrocarbon induced modifications of the hepatic endoplasmic reticulum: concentric membrane arrays. *Environmental Health Perspectives*, 1:137-140.

**NORTON, T. M., JACOBSON, E. R., & SUNDBERG, J. P. 1990.** Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in a green turtle, *Chelonia mydas*. *Journal of Wildlife Diseases*, 26 (2): 265-270.

**NOWELL, L. H., & RESCK, E. A. 1994.** National standards and guidelines for pesticides in water, sediment, and aquatic organisms: application to water-quality assessments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 140:1-164.

**NTP, NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. 1989.** Fifth annual report on carcinogens: Summary 1989. *Research Triangle Park, NC: National Institutes of Environmental Health Sciences*, 103-106. *NTP Technical Report Number 89239*.

**O'CONNOR, T. P. 1991.** Concentrations of organic contaminants in mollusks and sediments at NOAA national status and trend sites in the coastal and estuarine United States. *Environmental Health Perspectives*, 90:69-73.

**OESTREICHER, M. I., SHUMAN, D. H., & WURSTER, C. F. 1971.** DDE reduces medullary bone formation in birds. *Nature*, 229:571.

**OLIVER, B. G., & NIIMI, A. J. 1988.** Trophodynamic analysis of polychlorinated biphenyl congeners and other chlorinated hydrocarbons in the Lake Ontario ecosystem. *Environmental Science & Technology*, 22:388-397.

**ONO, M., KANNAN, N., WAKIMOTO, T., & TATSUKAWA, R. 1987.** Dibenzofurans a greater global pollutant than dioxins? Evidence from analyses of open ocean killer whale. *Marine Pollution Bulletin*, 18:640-643.

**OPPERHUIZEN, A., GOBAS, F. A. P. C., & VAN DER STEEN, J. M. D. 1988.** Aqueous solubility of polychlorinated biphenyls related to molecular structure. *Environmental Science & Technology*, 22:638-646.

**ORÓS, J., ARENCIBIA, A., FERNÁNDEZ, L. & JENSEN, H. E. 2004a.** Intestinal candidiasis in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*): an immunohistochemical study. *The Veterinary Journal*, 167: 202-207.

**ORÓS, J., CALABUIG, P. & DÉNIZ, S. 2004b.** Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. *Veterinary Record*, 155: 169-174.

**ORÓS, J., DELGADO, C. FERNÁNDEZ, L. & JENSEN, H. E. 2004c.** Pulmonary hyalohyphomycosis caused by *Fusarium* ssp in a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*): an immunohistochemical study. *New Zealand Veterinary Journal*, 52: 150-152.

**ORÓS, J., & TORRENT, A. 2001.** Necropsia. pp.: 29-63. En: Cabildo de Gran Canaria (EDS.). *Manual de Necropsia de Tortugas Marinas*.



**ORÓS, J., TORRENT, A., CALABUIG, P. & DÉNIZ, S. 2005.** Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Diseases of Aquatic Organisms*, 63: 13-24.

**ORTEGA, P. 1966.** Light and electron microscopy of dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT) poisoning in the rat liver. *Laboratory Investigation*, 15:657-679.

**O'SHEA, T. J., & BROWNELL JR, R. L. 1994.** Organochlorine and metal contaminants in baleen whales: a review and evaluation of conservation implications. *The Science of the Total Environment*, 154:179-200.

**PAGE, B. D., & LACROIX, G. 1997.** Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of semi-volatile organochlorine contaminants in aqueous matrices. *Journal of Chromatography A*, 757:173-182.

**PAPADI, G. P., BALAZS, G. H., & JACOBSON, E. R. 1995.** Flow cytometric DNA content analysis of fibropapillomas in green turtles *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22: 13-18.

**PARKE, D. V. 1980.** The metabolism and chemobiokinetics of environmental chemicals. pp. 85-105. En: **GALLI, C. L., MURPHY, S. D., & PALEOTI, R. (EDS.)**. The principles and methods in modern toxicology. *Elsevier, Amsterdam*.

**PARKINSON, A., & SAFE, S. 1987.** Mammalian biologic and toxic effects of PCBs. pp. 49-75. En: **SAFE, S., HUTZINGER, O. (EDS.)**. Polychlorinated biphenyls (PCBs), Mammalian and Environmental Toxicology, Environmental Toxin Series, vol. 1. *Springer, Heidelberg*.

**PARKKI, M. G., MARNIEMI, J., & VAINIO, H. 1977.** Long-term effects of single and combined doses of DDT and PCB on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 3:903-911.

**PATIL, G. S. 1991.** Correlation of aqueous solubility and octanol-water partition coefficient based on molecular structure. *Chemosphere*, 22:723-738.

**PAWLISZYN, J. 1997.** Solid Phase Microextraction, theory and practice. *Wiley-VCH, New York*.

**PAYNE, J. F., FANCEY, L. L., RAHIMTULA, A. D., & PORTER, E. L. 1987.** Reviews and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C 86:233-245.

**PEÑALVER, A. M. 2002.** Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. *PhD. Thesis. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona*. 309 pp.

- PÉREZ-JIMÉNEZ, A. 1997.** *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), pp. 435-437. En: **PLEGUEZUELOS, J. M. (ED.):** Distribución y Biogeografía de los Anfibios y Reptiles en España y Portugal. *Universidad de Granada*.
- PETERS, A., & VERHOEVEN, K. J. F. 1994.** Impact of artificial lighting on the seaward orientation of hatchling loggerhead sea turtles. *Journal of Herpetology*, 28: 112-114.
- PHILLIPS, D. J. H., & TANABE, S. 1989.** Aquatic pollution in the Far East. *Marine Pollution Bulletin*, 20: 297-293.
- PHILLIPS, J. B., & WELLS, M. R. 1974.** Adenosine Trisphosphatase Activity in liver, intestinal mucosa, cloacal bladder, and kidney tissue of five turtle species following *in vitro* treatment with 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane (DDT). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(3):404-407.
- PITARCH, E. A. 2001.** Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. *PhD. Thesis. Universitat Jaume I de Castellón, Castellón de la Plana*. 421 pp.
- PLATONOW, N. S., & KARSTAD, L. H. 1973.** Dietary effects of polychlorinated biphenyls on mink. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 37:391-400.
- PLOTKIN, P. 1989.** Feeding ecology of the loggerhead sea turtle in the norwestern Gulf of Mexico, pp. 139-141. En: **ECKERT, S. A., ECKERT, K. L., & RICHARDSON, T. H. (EDS.):** *Proceedings of the Annual Workshop on Sea Turtle Conservation and Biology*, 9. NOAA Technical Memorandum. NMFS-SEFC-232.
- PODREKA, S., GEORGES, A., MAHER, B., & LE, C. J. 1998.** The environmental contaminant DDE fails to influence the outcome of sexual differentiation in the marine turtle *Chelonia mydas*. *Environmental Health Perspective*, 106(4): 185-188.
- PORTER, W. P., HINSBILL, R., FAIRBROTHER, A, OLSON, L. J., JAEGER, J., YUILL, T., BISGAARD, S., HUNTER, W.G., & NOLAN, K. 1984.** Toxicant-disease environment interactions associated with suppression of immune system, growth and reproduction. *Science*, 224:1014-1017.
- POSTHAUS, H., KRAMPE, M., PAGAN, O., GUEHO, E., SUTER, C., & BACCIARINI, L. 1997.** Systemic paecilomycosis in a hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Journal de Mycologie Medicale*, 7 (4): 223-226.
- PROSEN, H., & ZUPANCIC-KRALJ, L. 1999.** Solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18:272-282.

**RAMESH, A., TANABE, S., SUBRAMANIAN, A. N., MOHAN, D., VENUGOPALAN, V. K., & TATSUKAWA, R. 1990.** Persistent organochlorine residues in green mussels from coastal waters of south India. *Marine Pollution Bulletin*, 21:587-590.

**RAPAPORT, R. A., & EISENREICH, S. J. 1984.** Chromatographic determination of octanol-water partition coefficients (K<sub>ow</sub>) for 58 polychlorinated biphenyl congeners. *Environmental Science & Technology*, 18:163-170.

**RECCHIA, C. A., & READ, A. J. 1989.** Stomach contents of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, from the Bay of Fundy. *Canadian Journal of Zoology*, 67:2140-2146.

**RELINDERS, P. J. H. 1986.** Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature (Lond.)*, 324:456-457.

**RIDGWAY, S., & REDDY, M. 1995.** Residue levels of several organochlorines in *Tursiops truncatus* milk collected at varied stages of lactation. *Marine Pollution Bulletin*, 30:609-614.

**RINGER, R. K. 1983.** Toxicology of PCBs in mink and ferrets. pp. 227-240. En: **D'ITRI, F., & KAMRIN, M. (EDS.)**. PCBs: human and environmental hazards. *Butterworth Publishers, Woburn, Mass.*

**RINGER, R. K., AULERICH, R. J., & ZABIK, M. 1972.** Effect of dietary polychlorinated biphenyls on growth and reproduction of mink. *Extended abstract. ACS (American Chemical Society) 164<sup>th</sup> Annu. Meet*, 12:149-154.

**RISEBROUGH, R. W. 1978.** Pollutants in marine mammals: a literature review and recommendations for research. *Marine Mammal Commission, National Technical Information Service, NB-290728, Washington DC*, 64pp.

**RISEBROUGH, R. W., RIECHE, P., PEAKALL, D. B., HERMAN, S. G., & KIRVEN, M. N. 1968.** Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature*, 220:1098-1102.

**RISEBROUGH, R. W., WALKER II, W., SCHMIDT, T. T., DE LAPPE, B. W., & CONNORS, C. W. 1976.** Transfer of chlorinated biphenyls to Antarctica. *Nature*, 264:738-739.

**RITTER, L., SOLOMON, K. R., FORGET, J., STEMEROFF, M., & O'LEARY, C. 1995.** An assessment report on: DDT-Aldrin-Dieldrin-Endrin-Chlordane Heptachlor-Hexa-chlorobenzene Mirex-Toxaphene Poly-chlorinated Biphenyls Dioxins and Furans. *The International Programme on Chemical Safety (IPCS) within the framework of the Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC)*.

- ROESIJADI, G., PETROCELLI, S. R., ANDERSON, J. W., GIAM, C. S., & NEFF, G. E. 1976.** Toxicity of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) to adult, juvenile, and larval stages of the shrimp *Palaemonetes pugio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 15:297-304.
- ROGAN, W. J., GLADEN, B. C., MCKINNEY, J. D., CARRERAS, R. N., HARDY, P., THULLEN, J., TINGELSTAD, J., & TULLY, M. 1986.** Polychlorinated biphenyls (PCB) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: Effects on growth, morbidity, and duration of lactation. *American Journal of Public Health*, 77:1294-1297.
- RONCEVIC, N., PAVKOV, S., GALETIN-SMITH, R., VUKOVIC, T., VOJINOVIC, M., & DJORDJEVIC, M. 1987.** Serum concentrations of organochlorine compounds during pregnancy and the newborn. *Environmental Contamination and Toxicology*, 38:117-124.
- ROYLANCE, K. J., JORGENSEN, C. D., BOOTH, G. M. & CARTER, M. W. 1985.** Effects of dietary endrin on reproduction of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 14:705-711.
- RYAN, J. J., B. P. Y., LAU, J. A., HARDY, W. B., STONE, P., O'KEEFE, & GIERTHY, J. F. 1986.** 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related dioxins and furans in snapping turtle (*Chelydra serpentina*) tissues. *Chemosphere*, 15:537-548.
- RYBITSKI, M. J., HALE, R. C., & MUSICK, J. A. 1995.** Distribution of organochlorine pollutants in Atlantic sea turtles. *Copeia*, 2:379-390.
- SABOURIN, T. D., STICKLE, W. B., MICHOT, T. C., VILLARS, C. E., GARTON, D. W., & MUSHINSKY, H. R. 1984.** Organochlorine residue levels in Mississippi river water snakes in southern Louisiana. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 32:460-468.
- SAFE, S. H. 1987.** Determination of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors (TEFs): Support for the use of the *in vitro* AHH induction assay. *Chemosphere*, 16:791-802.
- SAFE, S. H. 1990.** Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds, environmental and mechanistic considerations which support the development of Toxic Equivalency Factors (TEFs). *CRC Critical Review of Toxicology*, 21:51-58.
- SAFE, S. H. 1994.** Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implication for risk assessment. *Critical Review of Toxicology*, 24:87-149.
- SAFE, S. H. 1995.** Environmental and dietary estrogens and human health. Is there a problem?. *Environmental Health Perspectives*, 103(4): 346-351.

**SAKAI H., ICHIHASHI, H., SUGANUMA, H., & TATSUKAWA, R. 1995.** Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs. *Marine Pollution Bulletin*, 30:347-353.

**SALMON, M., & WITHERINGTON, B. E. 1995.** Artificial lighting and seafinding by loggerhead hatchlings: evidence for lunar modulation. *Copeia*, 1995 (4): 931-938.

**SANDERS, H. O., & CHANDLER, J. H. 1972.** Biological magnification of a polychlorinated biphenyl (Aroclor® 1254) from water by aquatic invertebrates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 7:257-263.

**SAXENA, M. P., GOPAL, K., JONES, W., & RAY, P. K. 1992.** Immune responses to *Aeromonas hydrophilia* in catfish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48:194-201.

**SCHROEDER, B. A. 1987.** *Annual Report of the Sea Turtle Stranding and Salvage Network Atlantic and Gulf Coasts of the United States January–December 1986*. NOAA/NMFS, Coastal Resource Division contribution number CRD-87/88-12, Miami, FL. 45 pp.

**SCHULMAN, A. A., & LUTZ, P. L. 1995.** The effect of plastic ingestion on lipid metabolism in the green sea turtle (*Chelonia mydas*), pp. 122-124. En: **RICHARDSON, J. I., & RICHARDSON, T. H. (Compilers):** Proceedings of the 12<sup>th</sup> Annual Workshop on Sea Turtle Conservation and Biology, *N.M.F.S. Technical Memorandum. NOAA-TM-NMFS-SEFSC-361, Miami, FL*.

**SCHULTZ, D. E., PETRICK, G., & DUINKER, J. C. 1989.** Complete characterization of polychlorinated biphenyl congeners in commercial Aroclor and Clophen mixtures by multidimensional gas chromatography-electron capture detection. *Environmental Science & Technology*, 23:852-859.

**SEAMAN, G. A., LOWRY, L. F., & FROST, K. J. 1982.** Foods of belukha whales *Delphinapterus leucas* in Western Alaska. *Cetology*, 44:1-19.

**SEEGAL, R. F., BUSH, B., & SHAIN, W. 1991.** Neurotoxicology of *ortho*-substituted polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, 23:1941-1949.

**SEGRE, M., ARENA, S. M., GREELEY, E. H., MELANCON, M. J., GRAHAM, D. A., & FRENCH, J. B., JR. 2002.** Immunological and physiological effects of chronic exposure of *Peromyscus leucopus* to Aroclor 1254 at a concentration similar to that found at contaminated sites. *Toxicology*, 174:163-172.

**SEMINOFF, J. A., RESENDIZ, A., RESENDIZ, B., & NICHOLS, W. J. 2004.** Occurrence of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Gulf of California, Mexico: Evidence of life- history variation in the Pacific Ocean. *Herpetological Review*, 35(1):24-27.

- SHABICA, V. S. 1981.** Planning for protection of sea turtle habitat. pp. 519-522. En: **BJORNDAL, A. K. (ED.)**. Biology on Conservation of Sea Turtles, Washington DC.
- SHANK, F., 1991.** Statement before the Committee on Governmental Affairs, U.S. Senate. GAO/PEMD-92-3.
- SHARPE, R. M., & SKAKKEBAEK, N. E. 1993.** Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?. *Lancet*, 341:1392-1395.
- SHELTON, D. W., HENDRICKS, J. D., COULOMBE, R. A., & BAILEY, G. S. 1984.** Effect of dose on the inhibition of carcinogenesis/mutagenesis by Aroclor 1254 in rainbow trout fed aflatoxin B1. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 13:649-657.
- SILKWORTH, J. J. B., & GRABSTEIN, E. M. 1982.** Polychlorinated biphenyl immunotoxicity: dependence on isomer planarity and the Ah gene complex. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 65:109-115.
- SIMMONDS, M. 1992.** Ceatacean mass mortalities and their potential relationship with pollution. En: The Symposium on Whales-Biology-Threats-Conservation, 5-7 June 1991, *Brussels, Belgium*.
- SIMMONDS, M. 1994.** Saving Europe's dolphins. *Oryx*, 28:238-248.
- SIPES, I. G., & GANDOLFI, A. J. 1991.** Biotransformation of toxicants. pp. 88-126. En: **AMBUR, M. O., DOULL, J., & KLAASSEN, C. D. (EDS.)**. The basic science of poisons. 4<sup>th</sup> Edn. McGraw-Hill, Inc., New York.
- SISON, T. M., PADILLA, M. A., VIZMANOS, M. C., & FOLLOSCO, M. 1990.** Isolation and identification of fungi found in necrotic skin lesions of captive marine turtles (*Eretmochelys imbricata*). *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, 27 (2): 35-36.
- SIVARAJAH, K., FRANKLIN, C. S., & WILLIAMS, W. P. 1978b.** Some histopathological effects of Aroclor 1254 on the liver and gonads of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, 13:411-414.
- SLEIGHT, S. D. 1983.** Pathologic effects of PCBs in mammals. pp. 215-226. En: **D'ITRI, F., & KAMRIN, M. (EDS.)**. PCBs: human and environmental hazards. *Butterworth Publishers, Woburn, Mass.*
- SMITH, G. M., & COATES, C. W. 1938.** Fibro-epithelial growths of the skin in large marine turtles, *Chelonia mydas* (Linnaeus). *Zoologica*, 23: 93-98.

**SMITH, R. M., & COLE, C. F. 1973.** Effects of egg concentrations of DDT and dieldrin on development in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 30:1894-1898.

**SNARSKI, V. M. 1982.** The response of rainbow trout *Salmo gairdneri* to *Aeromonas hydrophila* after sublethal exposures to PCB and copper. *Environmental Pollution Serie A Ecological and Biological*, 28: 219-232.

**SNG, M. T., LEE, F. K., & LAKSO, H. A. 1997.** Solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides from water. *Journal of Chromatography A*, 759: 225-230.

**SOTO, A. M., SONNENSCHNEIN, C., CHUNG, K. L., FERNANDEZ, M. F., OLEA, N., & SERRANO, O. 1995.** The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspect*, 103(7): 113-122.

**SPARLING, D. W., BISHOP, C. A., PAULI, B. D., & MONEY, S. 2000.** Epilogue: lessons yet to be learned. pp.: 811-822. En: **SPARLING, D. W., LINDER, G. L., & BISHOP, C. A. (EDS.)**. The Ecotoxicology of Amphibians and reptiles. *Chapter 15. Pensacola, F.L.: Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press*.

**SPIES, R. B., & RICE JR., D. W. 1988.** Effects of organic chemicals of the starry flounder *Platichthys stellatus* in San Francisco Bay: II. Reproductive success of fish captured in San Francisco Bay and spawned in laboratory. *Marine Biology*, 98:191-200.

**STACK, A. S., ALTMAN-HA-MAMDZIC, S., MORRIS, P. J., LONDON, S. D., & LONDON, L. 1999.** Polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) inhibit LPS-induced murine splenocyte proliferation in vitro. *Toxicology*, 139:137-154.

**STAUFFER, T. W. 1979.** Effects of DDT and PCB's on survival of lake trout eggs and fry in a hatchery and in Lake Michigan, 1973-1976. *Transactions of the American Fisheries Society*, 108:178-186.

**STERN, G. A., MUIR, D. C. G., SEGSTRO, M. D., DIETZ, R., & HEIDE-JORGENSEN, M. P. 1994.** PCBs and other organochlorine contaminants in white whales (*Delphinapterus leucas*) from West Greenland: variations with age and sex. *Meddelelser om Gronland. Bioscience*, 39:245-259.

**STICKEL, L. F. 1973.** Pesticide residues in birds and mammals. pp.: 254-312. En: **EDWARDS, C. A. (ED.)**. *Environmental Pollution by Pesticides*. Plenum, New York,

**STICKEL, W. H. 1975.** Some effects of pollutants in terrestrial ecosystems. pp.: 25-74. En: **MCINTYRE A. D., & MILLS, C. F. (EDS.)**. *Ecological Toxicology Research*. Plenum, New York.

- STICKEL, W. H., STICKEL, L. F., DYRLAND, R. A., & HUGHES, D. L. 1984a. DDE in birds: lethal residues and loss rates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13:1-6.
- STICKEL, W. H., STICKEL, L. F., DYRLAND, R. A., & HUGHES, D. L. 1984b. Aroclor 1254 residues in birds: lethal levels and loss rates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13:7-13.
- STONEBURNER, D. L., NICORA, M. N., & BLOOD, E. R. 1980. Heavy metals in loggerhead sea turtle eggs (*Caretta caretta*): evidence to support the hypothesis that demes exist in the western Atlantic populations. *Herpetologica*, 14:171-175.
- STORELLI, M. M., & MARCOTRIGIANO, G. O. 2000. Chlorobiphenyls, HCB, and organochlorine pesticides in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimens beached along the Adriatic Sea, Italy. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64:481-488.
- STRUGER, J., ELLIOT, J. E., BISHOP, C. A., OBBARD, M. E., NORSTROM, R. J., WESELOH, D. V., SIMON, M., & NG, P. 1993. Environmental contaminants in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes-St. Lawrence River basin of Ontario, Canada (1981,1984). *Journal of Great Lakes Research*, 19:681-694.
- SUBRAMANIAN, A. N., TANABE, S., & TATSUKAWA, R. 1988a. Estimating some biological parameters of Baird's beaked whales using PCBs and DDEs as tracers. *Marine Pollution Bulletin*, 19:284-287.
- SUBRAMANIAN, A. N., TANABE, S., & TATSUKAWA, R. 1988b. Use of organochlorines as chemical tracers in determining some reproductive parameters in Dalli-type Dall's porpoise *Phocoenoides dalli*. *Marine Environmental Research*, 25:161-174.
- SUBRAMANIAN, A. N., TANABE, S., & TATSUKAWA, R., SAITO, S., & MIYAZAKI, N. 1987. Reduction in the testosterone levels by PCBs and DDE in Dall's porpoises of northwestern North Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 18:643-646.
- SUBRAMANIAN, B. R., TANABE, S., HIDAKA, H., & TATSUKAWA, R. 1983. DDTs and PCB isomers and congeners in Antarctic fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 12:621-626.
- SUMPTER, J. P., & JOBLING, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103(7):173-178.
- SZEFER, P., SZEFER, K., PEMPKOWIAK, J., SKWARZEC, B., BOJANOWSKI, R., & HOLM, E. 1994. Distribution and coassociations of selected metals in seals of the Antarctic. *Environmental Pollution*, 83:341-349.



**TAKEOKA, H., RAMESH, A., IWATA, H., TANABE, S., SUBRAMANIAN, A. N., MOHAN, D., MAGENDRON, A., & TATSUKAWA, R. 1991.** Fate of the insecticide HCH in the tropical coastal area of South India. *Marine Pollution Bulletin*, 22:290-297.

**TANABE, S., HIDAHA, H., & TATSUKAWA, R. 1983.** PCBs and chlorinated pesticides in Antarctic atmosphere and hydrosphere. *Chemosphere*, 12:277-288.

**TANABE, S., IWATA, H., & TATSUKAWA, R. 1994.** Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *The Science of the Total Environment*, 154:163-177.

**TANABE, S., KANNAN, N., SUBRAMANIAN, A., WATANABE, S., & TATSUKAWA, R. 1987a.** Highly toxic coplanar PCBs: occurrence, source, persistency, and toxic implications to wildlife and humans. *Environmental Pollution*, 47:147-163.

**TANABE, S., LOGANATHAN, B. G., SUBRAMANIAN, A., & TATSUKAWA, R. 1987b.** Organochlorine residues in short-finned pilot whale: Possible use as a tracers of biological parameters. *Marine Pollution Bulletin*, 18:561-563.

**TANABE, S., MADHUSREE, B., ÖZTÜRK, A. A., TATSUKAWA, R., MIYAZAKI, N., ÖZDAMAR, E., ARAL, O., SAMSUN, O., & ÖZTÜRK, B. 1997a.** Persistent organochlorine residues in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 34(5):338-347.

**TANABE, S., MADHUSREE, B., ÖZTÜRK, A. A., TATSUKAWA, R., MIYAZAKI, N., ÖZDAMAR, E., ARAL, O., SAMSUN, O., & ÖZTÜRK, B. 1997b.** Isomer-specific analysis of polychlorinated biphenyls in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 34(9):712-720.

**TANABE, S., MIURA, S., & TATSUKAWA, R. 1986.** Variations of organochlorine residues with age and sex in Antarctic minke whale. *Proceedings of the Eighth Symposium on Polar Biology, 1985. Mem Nat Inst Polar Res (Japan)* (Special Issue), 44:174-181.

**TANABE, S., MORI, T., & TATSUKAWA, R. 1984.** Bioaccumulation of DDTs and PCBs in southern minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Proceedings of the Sixth Symposium on Polar Biology. Mem Nat Inst Polar Res (Japan)* (Special Issue), 32:140-150.

**TANABE, S., MORI, T., TATSUKAWA, R., & MIYAZAKI, N. 1983.** Global pollution of marine mammals by PCBs, DDTs, HCHs (BHCs). *Chemosphere*, 12:1269-1275.

- TANABE, S., SUNG, J. K., CHOI, D. Y., BABA, N., KIYOTA, M. & TATSUKAWA, R. 1994. Persistent organochlorine residues in northern fur seal from the Pacific coast of Japan since 1971. *Environmental Pollution*, 85:305-314.
- TANABE, S., TANAKA, H., & TATSUKAWA, R. 1984. Polychlorobiphenyls,  $\Sigma$ DDT, and hexachlorocyclohexane isomers in the western North Pacific ecosystem. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13:731-738.
- TANABE, S., & TATSUKAWA, R. 1986. Distribution, behavior, and load of PCBs in the oceans. pp. 144-161. En: WAID, J. S. (ED.). PCBs in the Environment, vol. II. *CRC Press, Boca Raton, FL*.
- TANABE, S., TATSUKAWA, R., MARUYAMA, K., & MIYAZAKI, N. 1982. Transplacental transfer of PCBs and chlorinated hydrocarbon pesticides from the pregnant striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) to the fetus. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46:1249-1254.
- TEAS, W. G. 1991. Sea turtle stranding and salvage network: green turtles, *Chelonia mydas*, and fibropapillomas, pp. 89-93. En: BALAZS, G. H., & POOLEY, S. G. (EDS.): Research Plan for Marine Turtle Fibropapilloma. *NOAA-TM-NMFS-SWFSC-156, National Oceanographic and Atmospheric Administration, Honolulu, Hawaii*.
- TEAS, W. G. 1994. Annual Report of the Sea Turtle Stranding and Salvage Network Atlantic and Gulf Coasts of the United States January-December 1993. *NOAA/NMFS, Miami Laboratory contribution number MIA-94/95-12, Miami, FL. 46 pp.*
- THOMANN, R. V. 1981. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38:280-296.
- THOMAS, K. B., & COLBORN, T. 1992. Organochlorine endocrine disruptors in human tissues. pp.: 365-394. En: COLBORN, T., & CLEMENT, C. (EDS.). Chemically induced alterations in sexual and development: the wildlife-human connection. *Princeton, NJ: Princeton Scientific*.
- THOMAS, P. 1988. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. *Marine Environmental Research*, 24:179-183.
- THOMPSON, N. P., RANKIN, P. W., & JOHNSTON, D. W. 1974. Polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE in green turtle eggs from Ascension Island, South Atlantic Ocean. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11:399-406.
- TILLET, D. E., ANKLEY, G. T., VERBRUGGE, D. A., GIESEY, J. P., LUGWIG, J. P., & KUBIAK, T. J. 1991. H4IIE rat hepatoma cell bioassay-derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents in

colonial fish-eating waterbird eggs from the Great Lakes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21:91-101.

**TOMASIK, A., TARNAWSKI, K., BECK, B., KASPERCZYK, S., & BRZOZA, Z. 1995.** Origin of serum alpha-amylase isoenzymes from healthy adults rats. *Materia Medica Polona*, 27(2): 57-61.

**TOSCANO, M. A., SALVO, F., & CHIOFALO, B. 1995.** Composizione in acidi grassi di *Caretta caretta caretta*. *La rivista italiana delle sostanze grasse LXXII*, 159-162.

**UPTON, S. J., ODELL, D. K., & WALSH, M. T. 1990.** *Eimeria caretta* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta* (Testudines). *Canadian Journal of Zoology*, 68(6): 1268-1269.

**VARGO, S., LUTZ, P., ODELL, D., VAN VLEET, E., & BOSSART, G. 1986.** Study of the effects of oil on marine turtles. *Final Report. MMS 86-0070. Vienna, VA: U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service.*

**VÁZQUEZ, G. F., REYES, M. C., FERNÁNDEZ, G., AGUAYO, J. E. C., & SHARMA, V. K. 1997.** Contamination in marine turtle (*Dermochelys coriacea*) egg shells of Playon de Mexiquillo, Michoacan, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58:326-333.

**VOLLHARDT, K. P. C., & SCHORE, N. E. 2000.** Los Compuestos químicos halogenados y el medio ambiente. pp.: 213-242. En: **OMEGA S.A. (EDS.)**. Propiedades y reacciones de los haloalcanos: sustitución nucleófila biomolecular. *Química Orgánica. Estructura y Función 3ªed.* Tema 6. Barcelona.

**VOM SAAL, F. S., MONTANO, M. M., & WANG, M. H. 1992.** Sexual differentiation in mammals. pp 17-84. En: **COLBORN, T., CLEMENT, C. (EDS.)**. Chemically Induced Alterations in Sexual and Funcional Development: The Wildlife/Human Connection. *Princeton Scientific Publishing, Princenton, NJ.*

**WADE, JR., L. G. 1993.** Halogenuros de alquilo. pp.: 177-241. En: **PRENTICE-HALL HISPANOAMERICANA S.A. (EDS.)**. Química Orgánica 2nd ed. Tema 5. México.

**WADE, JR., L. G. 1993.** Lo natural no es siempre verde: pesticidas de origen natural. pp.: 1118-1149. En: **PRENTICE-HALL HISPANOAMERICANA S.A. (EDS.)**. Heterociclos: compuestos. Química Orgánica 2nd ed. Tema 25. México.

**WALDICHUK, M. 1987.** Sea turtles- endangered species. *Marine Pollution Bulletin*, 18:623-627.

**WALKER, C. H. 1980.** Species variations in some hepatic drug metabolizing encimes. *Progress in Drug Metabolism*, 5:113-164.

- WANIA, F., & MACKAY, D. 1996.** Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science & Technology*, 30:211-216.
- WATERMANN, B., & KRANZ, H. 1992.** Pollution and fish diseases in the North Sea. Some historical aspects. *Marine Pollution Bulletin*, 24:131-138.
- WERCINSKI, S. S. A. 1999.** Solid phase microextraction. A practical guide. *Marcel Dekker, Inc., California*.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1971.** The place of DDT in operations against malaria and other vector-borne diseases. *Official records of the WHO association, N°190. Executive Board forty-seven session. Part II. Report on the proposed programme and budget estimates for 1972. Appendix 14. WHO:Geneva*, pp.176-182.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1976.** Polychlorinated biphenyl and terphenyls. *WHO, Geneva*. pp. 85.
- WIBBELS, T., BULL, J. J., & CREWS, D. 1991.** Synergism between temperature and stradiol: a common pathway. *Journal of Experimental Zoology*, 260:130-134.
- WIBBELS, T., BULL, J. J., & CREWS, D. 1991.** Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology*, 260:371-381.
- WIBBELS, T., BULL, J. J., & CREWS, D. 1992.** Hormone-induced sex determination in an amniotic vertebrate. *Journal of Experimental Zoology*, 262:454-457.
- WILES, M., & RAND, T. G. 1987.** Integumental ulcerative disease in a loggerhead turtle *Caretta caretta* at the Bermuda Aquarium: microbiology and histopathology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 3: 85-90.
- WILLIAMS, L. L., & GIESY, J. P. 1992.** Relationships among concentrations of individual polychlorinated biphenyl (PCB) congeners, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin equivalents (TCDD-EQ), and rearing mortality of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs from Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research*, 18:108-124.
- WILLINGHAM, E., & CREWS, D. 1999.** Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *General and Comparative Endocrinology*, 113:429-435.
- WINSTON, G. W., NARAYAN, S., & HENRY, C. B. 1989.** Induction pattern of liver microsomal alkoxyresorufin *O*-dealkylases of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): correlation with PCB exposure *in*

situ. *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 24:277-289.

**WITHERINGTON, B. E. 1992.** Behavioral responses of nesting sea turtles to artificial lighting. *Herpetologica*, 48 (1): 31-39.

**WOFFORD, H. W., & THOMAS, P. 1988.** Effect of xenobiotics on peroxidation of hepatic microsomal lipids from striped mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Marine Environmental Research*, 24:285-289.

**WOJCIK, J., CZEKAJ, H., KOZACZYNSKI, W., & NIEWIADOWSKA, A. 1995.** Polychlorinated biphenyls: a possible agent of neurological disorders observed in young snakes. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 39:53-57.

**WOLKE, R. E., BROOKS, D. R., & GEORGE, A. 1982.** Spirorchidiasis in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Wildlife Diseases*, 18: 175-185.

**WOLKE, R. E., & GEORGE, A. 1981.** Sea Turtle Necropsy Manual. *NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-24*. Kingston, Rhode Island. 20pp.

**WORK, T. M., RAMEYER, R. A., BALAZS, G. H., CRAY, C., & CHANG, S. P. 2001.** Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 37:574-581.

**WREN, C. D. 1991.** Cause-effect linkages between chemicals and populations of minks (*Mustela vison*) and otter (*Lutra canadensis*) in the Great Lakes basin. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 33(4):549-586.

**ZEPP JR., R. L., & KIRKPATRICK, R. L. 1976.** Reproduction in cottontails fed diets containing a PCB. *Journal of Wildlife Management*, 40:491-495.

**ZISWILER, V. 1986.** Clase Reptiles Reptilia. pp.: 23-72. En: **OMEGA (EDS.). Zoología especial. Vertebrados.** Tomo II: Amniotas. *Barcelona*.