

Programa de Estudios de Posgrado

**METABOLISMO OXIDATIVO ASOCIADO A LA
PRESENCIA DE TUMORES EN TORTUGAS
MARINAS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Paloma Alejandra Valdivia Jiménez

La Paz, B. C. S., diciembre 2003

COMITÉ TUTOTIAL

Alonso A. Aguirre DVM., MS., Ph D.

Susan C. Gardner Ph D.

Tania Zenteno-Savín Ph D.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Alonso A. Aguirre DVM., MS., Ph D.

Susan C. Gardner Ph D.

Tania Zenteno-Savín Ph D.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Alonso A. Aguirre DVM., MS., Ph D.

Susan C. Gardner Ph D.

Tania Zenteno-Savín Ph D.

Suplente: Humberto Mejía Ruíz Ph D.

RESUMEN

Se sabe que el metabolismo oxidativo (agentes pro-oxidantes y antioxidantes) es un indicador del estado de salud de los organismos, por lo que en este estudio se determinó el metabolismo oxidativo basal en tejidos y sangre de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) y tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*); se analizaron las diferencias existentes entre los tejidos y las diferencias por grupos de edad, sexo, estación del año y localidad. Por otra parte, se hizo una evaluación de la utilidad del metabolismo oxidativo como biomarcador de la fibropapilomatosis (FP), una enfermedad neoplásica que afecta a las tortugas marinas en varias partes del mundo. Las muestras de organismos sin FP fueron colectadas en Baja California, México, debido a que en este sitio no se ha reportado la presencia de FP, mientras las muestras de tortugas con FP se colectaron en Hawaii, E.U.A.

Los parámetros del metabolismo oxidativo evaluados fueron la producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los niveles de peroxidación lipídica como indicadores de la presencia de radicales libres y el daño oxidativo, respectivamente; así mismo, se evaluaron las defensas antioxidantes midiendo la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST).

Los resultados muestran la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tejidos de tortugas marinas. El corazón y el riñón mostraron los niveles más bajos de producción de $O_2^{\cdot-}$, mientras que los tumores presentaron los niveles más elevados de peroxidación de lípidos. En cuanto a las enzimas antioxidantes, el hígado, músculo y los tumores mostraron una elevada actividad de SOD, mientras que el hígado y el riñón presentaron la mayor actividad de CAT y de GST. El patrón del metabolismo oxidativo en las tortugas negras resultó ser similar en otros reptiles. En cuanto a los grupos de edad, los adultos resultaron tener una mayor peroxidación de lípidos en el riñón. Con respecto a las estaciones del año, se encontraron diferencias en la CAT del hígado, la SOD y la GST del músculo, y en la GST de la sangre. Por último, se encontraron diferencias en la actividad de la CAT con respecto a las localidades de colecta en Hawaii.

El metabolismo oxidativo aparentemente no es un buen indicador de la FP, ya que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes en la sangre de individuos sanos y enfermos de Hawaii; no obstante, la actividad de estas enzimas es significativamente menor que las de la península de Baja California.

Palabras clave: estrés oxidativo, antioxidantes, tortugas marinas, fibropapilomatosis.

Vo. Bo.

Tania Zenteno-Savín PhD.
Directora de tesis

ABSTRACT

It is well known that the oxidative metabolism (pro-oxidant and antioxidant agents) is a good health indicator in organisms, thus, in this study were established the base line information on oxidative metabolism in tissue and blood samples of black and green sea turtles (*Chelonia mydas*) and black sea turtles (*Chelonia mydas agassizii*). Differences among tissues were found, as well as differences among age groups, sex, seasons and localities. Sea turtles around the world are afflicted by a neoplastic disease called fibropapillomatosis (FP), thus, the potential use of oxidative metabolism as biomarker of FP was assessed. Samples from turtles without FP were collected in Baja California, Mexico, because FP has not been reported in this region, while samples of sea turtles with FP were collected in Hawaii, E.U.A., where the FP presence is alarming.

The superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) production and the lipid peroxidation levels were determined as indicators of the presence of and the damage produced by free radicals, respectively. Besides, the antioxidant defenses were evaluated measuring the activity of some antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST).

The results show differences in the oxidative metabolism among sea turtles tissues ($p \leq 0.05$); heart and kidney showed the lowest levels of $O_2^{\cdot-}$ production, while tumors revealed the highest levels of lipid peroxidation. With regards to antioxidant enzymes, liver, muscle and tumors showed the highest SOD activity, while liver and kidney showed the highest CAT and GST activities. The oxidative metabolism pattern in black sea turtles is similar to other reptiles. Significant differences were found in kidney lipid peroxidation of adults and subadults. With regards to seasons, differences were observed in the liver CAT activity, in the SOD and GST activities of the pectoral muscle, and in the blood GST activity. Differences in the CAT activity in both Hawaiian sampling areas were revealed.

Contrary to expectations, the oxidative metabolism can not be considered as a good FP biomarker because no significant differences were evidenced in the blood and in the antioxidant enzyme activities between healthy and sick individuals of Hawaii; however, the activity of these enzymes were significantly lower than those from the Baja California organisms.

Vo. Bo.

Tania Zenteno-Savín PhD.
Directora de tesis

En memoria de mi tía Gelos:

Por todo el apoyo incondicional, constante y desinteresado hacia mí,

por haberme dejado aprender de su persona,

por inculcarme el amor al estudio,

pero sobre todo:

por haber creído siempre en mí.



AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 166326, así como por el financiamiento otorgado (proyecto G35437B) junto con el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)

Gracias a mi comité tutorial: A la Dra. Tania Zenteno-Savín por haberme metido en esto del estrés oxidativo, por su confianza, paciencia, tiempo, por su apoyo profesional, pero principalmente por su amistad. A la Dra. Susan Gardner por introducirme en el mundo de las tortugas marinas, por su apoyo en las salidas a campo y en el Simposium PRIMO12, además de su asesoría durante la realización de esta tesis. Al Dr. Alonso Aguirre por sus recomendaciones, por las muestras de tortugas de Hawaii, por enseñarme a trabajar con las tortugas y por la beca otorgada a través de Wildlife Trust, a quienes también doy las gracias.

Agradezco al CIBNOR por sus instalaciones y al Programa de Posgrado por su apoyo académico y por la extensión de beca. A la Dra. Thelma Castellanos, Leticia González, Osvelia Ibarra, Claudia Olachea, Lupita Sánchez y Bety Galvez. Gracias al personal del centro de cómputo; Horacio Sandoval y a Manuel Melero por toda su ayuda. Al personal de la biblioteca, en especial a Ana María Talamantes, Marco Antonio Díaz, Edgar Yuen y Ma. Esther Ojeda. A la Dra. Patricia Hernández, al Dr. Fernando García y a la técnico Angeles Navarrete por facilitarme su espectrofotómetro. A los laboratorios de Edafología y Bioquímica Fisiológica por su apoyo. Gracias al Dr. Juan Antonio de Anda por hecharme la mano con la estadística.

Gracias al Grupo Tortuguero de las Californias: A Wallace J. Nichols y a Wildcoast, así como a Jeffrey A. Seminoff y a Earth Watch a por permitir nuestra participación en sus monitoreos y la toma de muestras, además de sus consejos y su ejemplo de perseverancia. A Toño Resendiz por su hospitalidad en Bahía de Los Angeles y por inyectarnos energía. A Miguel Valenzuela y a Erubiel Patrón por facilitar nuestro trabajo, por el entusiasmo que han tomado para trabajar con las tortugas, y por su valiosa amistad. A Memo y Martina por su gran cooperación en la colecta de muestras, por su interés hacia nuestro trabajo, por su hospitalidad, su confianza y por su amistad. Gracias a la School for Field Studies (SFS) por ayudarnos a almacenar algunas muestras.

Gracias al Dr. George Balazs por sus sugerencias y por su ayuda en la toma de muestras en Hawaii. A Honolulu Laboratory y al National Fisheries Services. A Ohio University por adoptarme como su alumna durante un mes. Especialmente agradezco al Dr. Peter Johnson por su gran apoyo, sus enseñanzas y las facilidades que me otorgó en Ohio.

A mis compañeros tortugueros: Amaury Cordero, Arturo Juárez, Sionnan Fitzgerald, Itzel Sifuentes, Héctor Castelán y Rodrigo Rangel, por haber trabajado en equipo, por ayudarme a coleccionar muestras y por dejarme aprender de cada uno de ustedes.

Al grupo de estrés oxidativo: Mauricio Ahuejote, Estrellita Clayton, Mariana Morales, José Pablo Vázquez, Juan Carlos Urbiola, Juan Larrinaga, Jorge del Angel, Katina Ramírez, Norma Olguín y James Greig por hacer tan agradable el trabajo en el laboratorio, por haberme apoyado y por sus valiosos comentarios, además de su amistad.

Agradezco también a los choferes del CIBNOR: Benjamín Bareño, Fernando Montaña, Alberto Salgado y Simón Lucero, quienes nos apoyaron siempre en las salidas de campo y las hicieron más agradables.

Gracias a toda mi familia por estar siempre al pendiente de mí y por dejarme sentir su apoyo desde tan lejos.

Agradezco también a mis amigos de toda la vida: Nidia, Claus, Marisol, Natalia, Ivonne, Karina, Gaby, Zulema, Héctor y Rich: gracias por no olvidarme durante todo este tiempo y por jalarme las orejas de vez en cuando.

Quiero también dar las gracias a todos mis compañeros de maestría, quienes han sido mi familia aquí en La Paz, y que día a día han estado junto a mí brindándome su amistad y apoyo en las buenas y en las malas.

Por último quiero darle las gracias a Flavio González Estrada: por dejarme contar contigo, por tenerme paciencia, por estar junto a mí en todo momento, por apoyarme en mis decisiones y sobretodo por compartir conmigo este momento de nuestras vidas.

CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
CONTENIDO	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).....	15
1.1.1. Daño producido por las EROs	17
1.2. Sistema Antioxidante.....	19
1.2.1. Enzimas Antioxidantes	20
1.3. Biología de las Tortugas Marinas	26
1.3.1. Taxonomía y Especies de Tortugas Marinas	26
1.3.2. Características Generales.....	27
1.4. Tortuga Verde <i>Chelonia mydas</i> (Linnaeus, 1758).....	28
1.4.1. Distribución	28
1.4.2. Ciclo de Vida	28
1.4.3. Estatus Taxonómico.....	30
1.4.4. Morfología	30
1.4.5. Estado de Conservación.....	32
1.5. Fibropapilomatosis (FP)	33
2. ANTECEDENTES	35
2.1. Bioquímica Sanguínea de Tortugas Verdes.....	35
2.2. Varios Aspectos del Metabolismo Oxidativo	37
2.2.1. Daño al ADN y Cáncer.....	37
2.2.2. Biomarcadores	37
2.2.3. Estudios en Reptiles.....	39
2.2.3.1. Tortugas Marinas	39
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	40

5. OBJETIVOS	41
5.1. Objetivo general.....	41
5.2. Objetivos particulares	41
6. MATERIALES Y MÉTODOS	42
6.1. Área de Estudio.....	42
6.1.1. Península de Baja California, México	42
6.1.2. Hawaii, E.U.A.....	43
6.2. Obtención de Muestras	48
6.3. Análisis de Laboratorio.....	50
6.3.1. Producción de Radical Superóxido (O_2^-)	50
6.3.2. Determinación de la Peroxidación de Lípidos.....	51
6.3.3. Cinéticas Enzimáticas.....	52
6.3.3.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	53
6.3.3.2. Catalasa (CAT).....	54
6.3.3.3. Glutación S Transferasa (GST).....	55
6.3.3.4. Determinación de Proteínas.....	56
6.3.3.5. Determinación de Hemoglobina.....	56
6.4. Análisis Estadísticos	57
7. RESULTADOS	59
7.1. Comparaciones Dentro de los Grupos	59
7.1.1. Factores Bióticos.....	59
7.1.1.1. Grupos de Edad.....	59
7.1.1.2. Sexo	64
7.1.1.3. Grado de Severidad de la Fibropapilomatosis (FPS).....	66
7.1.2. Factores Abióticos	70
7.1.2.1 Estación del Año.....	70
7.1.2.2. Localidad	74
7.2. Tortugas Negras Sanas vs. Tortugas Verdes con FP.....	80
7.2.1. Tejidos	80
7.2.1.1. Producción de Radical Superóxido (O_2^-)	82
7.2.1.2. Peroxidación de Lípidos (TBARS).....	84
7.2.1.3. Enzimas Antioxidantes	86
7.2.1.3.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	86
7.2.1.3.2. Catalasa (CAT)	88
7.2.1.3.3. Glutación S-transferasa (GST).....	90
7.2.1.4. Análisis de Funciones Discriminantes.....	92
7.2.2. Sangre	81
7.2.2.1. Enzimas Antioxidantes	81
7.2.2.1.1. Superóxido Dismutasa (SOD)	83
7.2.2.1.2. Catalasa (CAT)	84
7.2.2.1.3. Glutación S-transferasa (GST).....	85
7.3. Comparación Con Otros Reptiles	86

7.3.1 Peroxidación de Lípidos (TBARS).....	86
7.3.2. Superóxido Dismutasa (SOD)	86
7.3.3. Catalasa (CAT)	87
7.3.4. Glutación S-transferasa (GST).....	88
8. DISCUSIÓN	90
8.1. Factores Bióticos y Abióticos	90
8.1.1. Edad	90
8.1.2. Sexo	91
8.1.3. Grado de Severidad de la Fibropapilomatosis (FPS).....	91
8.1.4. Estaciones del Año.....	92
8.1.5. Localidad	93
8.2. Metabolismo Oxidativo en Tejidos de Tortugas Marinas	94
8.2.1. Corazón.....	95
8.2.2. Hígado.....	95
8.2.3. Músculo	97
8.2.4. Pulmón.....	97
8.2.5. Riñón.....	98
8.2.6. Tumores	99
8.3. Análisis de Funciones Discriminantes.....	101
8.4. Comparación con Otros Reptiles	103
8.5. Tortugas Marinas con y sin FP	104
8.5.1. Sangre	104
9. CONCLUSIONES.....	109
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	110
11. LITERATURA CITADA	112
APÉNDICES	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reducción univalente del oxígeno molecular y producción de EROs	15
Figura 2. Peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).....	18
Figura 3. Metabolismo oxidativo: fuentes de generación y sistemas de eliminación de las EROs.....	20
Figura 4. 1) Reacción de Fenton. 2) Reacción de Haber-Weiss	24
Figura 5. Ciclo de vida de las tortugas marinas.....	29
Figura 6. La tortuga negra <i>Chelonia mydas agassizii</i>	31
Figura 7. A) Morfología externa de la tortuga verde; caparazón ovalado, B) Morfología externa de la tortuga negra; caparazón en forma de corazón, C) Cabeza.....	31
Figura 8. Fibropapilomas externos en tortugas verdes	34
Figura 9. Zonas de muestreo en Baja California, México	45
Figura 10. Zona de estudio en Hawaii	46
Figura 11. Área de distribución y principales sitios de anidación de las poblaciones de <i>Chelonia mydas</i> bajo estudio	47
Figura 12. A) Ubicación del seno venoso cervical, B) Longitud recta del carapacho mínima (LRC).....	49
Figura 13. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en tejidos de tortugas negras pertenecientes a diferentes grupos de edad.....	61
Figura 14. Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) en diferentes tejidos de adultos y subadultos de tortugas negras.	61
Figura 15. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en los tejidos de tortugas negras dependiendo de su edad.....	62
Figura 16. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos, por grupo de edad, en tortugas negras	63

Figura 17. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT), C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas negras segregadas por sexos	65
Figura 18. La producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en el tejido tumoral de tortugas verdes con diferente FPS	67
Figura 19. Peroxidación de lípidos (TBARS) de fibropapilomas de tortugas verdes con un diferente FPS.....	67
Figura 20. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en tumores de tortugas verdes dependiendo del grado de FPS	68
Figura 21. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes con diferente FPS	69
Figura 22. La producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en tejidos de tortugas negras colectadas en diferentes estaciones del año en Baja California, México.....	71
Figura 23. Peroxidación de lípidos (TBARS) en diferentes tejidos tortuga negras obtenidos en las cuatro estaciones del año en Baja California.....	71
Figura 24. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en los tejidos de tortugas negras dependiendo de la estación del año en Baja California	72
Figura 25. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes en las distintas estaciones del año en Baja California	73
Figura 26. La producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en el tejido tumoral de tortugas verdes colectadas en diferentes localidades de Hawaii, EUA	75
Figura 27. Peroxidación de lípidos (TBARS) de fibropapilomas de tortugas verdes obtenidos en dos localidades de las Islas de Hawaii.....	75
Figura 28. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en tumores de tortugas verdes dependiendo de la localidad de colecta en las Islas de Hawaii	76
Figura 29. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT), C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes sin FP colectadas en dos localidades de Hawaii.....	77

Figura 30. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes con FP en dos localidades de las Islas de Hawaii.....	78
Figura 31. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas negras de tres localidades de la península de Baja California	79
Figura 32. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes.....	83
Figura 33. Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes.....	85
Figura 34. Actividad específica de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes	87
Figura 35. Actividad específica de la enzima Catalasa (CAT) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes.....	89
Figura 36. Actividad específica de la enzima Glutatión S-transferasa (GST) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes	91
Figura 37. Análisis discriminante del metabolismo oxidativo de tejidos de tortugas negras y verdes.....	87
Figura 38. Actividad específica de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) en sangre de tortugas marinas con y sin FP	83
Figura 39. Actividad específica de la enzima catalasa (CAT) en sangre de tortugas marinas con y sin FP.....	84
Figura 40. Actividad específica de la enzima glutatión S-transferasa (GST) en sangre de tortugas marinas con y sin FP	85

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Coeficientes de correlación (R^2) obtenidos de las regresiones lineales entre los diferentes parámetros del metabolismo oxidativo de tejidos y sangre de tortugas negras y la LRC de las mismas como indicador de edad	46
Tabla II. Coeficientes de correlación (R^2) obtenidos de las regresiones lineales entre los diferentes parámetros del metabolismo oxidativo de tejidos y sangre de tortugas verdes con FP y el grado de severidad de esta enfermedad (FPS)	52
Tabla III. Indicadores de daño oxidativo y defensas antioxidantes en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes.....	67
Tabla IV. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas.....	79
Tabla V. Enzimas antioxidantes en sangre de tortugas marinas con y sin fibropapilomas (FP).....	82
Tabla VI. Tabla comparativa del metabolismo oxidativo en diferentes órganos de algunos reptiles incluyendo a la tortuga negra (<i>Chelonia mydas agassizii</i>), la tortuga de agua dulce (<i>Trachemys scripta elegans</i>) y la serpiente (<i>Thamnophis sirtalis parietalis</i>).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análisis de varianza
CAT: catalasa
CDNB: 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno
dH₂O: agua destilada
e⁻: electrón
EDTA: etilenodiamina tetra acetato
EROs: especies reactivas de oxígeno
Estado II: cáncer invasivo con tumores <2 cm ≤ 5cm, o nódulos linfáticos involucrados
Estado IV: cáncer invasivo, metástasis
ECOG: eastern cooperative oncology group; escala utilizada para referirse al grado de actividad que un paciente con cáncer puede desempeñar.
ECOG 0-1: actividad totalmente normal ó supresión de activiad intensa.
ECOG 2-3: actividad física ambulatoria ó reposo en silla o cama el 50% del día.
Fe: hierro
FP: fibropapilomatosis
FPS: fibropapilomatosis score severity
GPx: glutatión peroxidasa
GR: glutatión reductasa
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado
GST: glutatión S-transferasa
H⁺: protón
Hb: hemoglobina
H₂O: agua
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
LRC: longitud recta del carapacho
MDA: malondialdehído
NaCl: cloruro de sodio
NADP⁺: dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
NADPH: dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina fosforilado reducido
NBT: nitroazul tetrazolio
nmoles/g peso húmedo: nanomoles por gramo de peso húmedo
nmoles/min*g peso húmedo: nanomoles por minuto por gramo de peso húmedo
O₂: oxígeno
O₂⁻: radical superóxido
OH: radical hidroxilo
8-OHdG: 8-dihidroxiguanosina
SOD: superóxido dismutasa
TBA: ácido tiobarbitúrico
TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA: ácido tricloracético
U/g Hb: unidades por gramo de hemoglobina

U/g proteína: unidades por gramo de proteína
mU/g proteína: miliunidades por gramo de proteína

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

La mayor parte del oxígeno (O_2) consumido por las células aeróbicas es reducido por la citocromo c oxidasa, utilizando 4 electrones para reducir al O_2 en $2H_2O$ sin liberar intermediarios, la anterior en virtud de dos ferrihemos y dos $Cu(II)$ como grupos prostéticos (Fridovich, 1998). Sin embargo, se sabe que en condiciones normales, entre el 2 y el 4% del O_2 consumido por las células vivas presenta una reducción monovalente, generando productos nocivos, conocidos como especies reactivas de O_2 (Simontacchi *et al.*, 2000). Dicho término se refiere a los radicales libres de O_2 , los cuáles son átomos, iones o moléculas con uno o más electrones no apareados en el orbital más externo, entre ellos se encuentran el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (el más reactivo de todos) (Gil del Valle *et al.*, 1999; Fridovich, 1998). Además, dentro de las EROs se incluye a otro tipo de moléculas derivadas del O_2 que tienen alta capacidad reactiva sin ser radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Gil del Valle *et al.*, 1999; Simontacchi *et al.*, 2000) (Fig. 1).

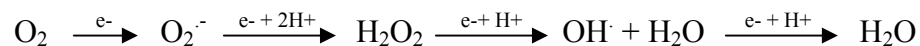


Figura 1. Reducción univalente del oxígeno molecular y producción de EROs. O_2 = oxígeno, $O_2^{\cdot-}$ = radical superóxido, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, OH^{\cdot} = radical hidroxilo, H_2O = agua, e^- = electrón, H^+ = protón (Fridovich, 1998; Martínez-Cayuela, 1998).

Dentro de las EROs, el $O_2^{\cdot-}$ es el más ampliamente producido *in vivo*, es un monoradical cargado negativamente (Gil del Valle *et al.*, 1999). Este radical es más selectivo en su reactividad que el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y, paradójicamente, es potencialmente más dañino, ya que puede difundir a una distancia considerable antes de encontrar su blanco; es intrínsecamente inestable en solventes próticos como agua, ya pH neutro es lo suficientemente estable como para oxidar compuestos como polifenoles, tioles, ascorbato, catecolaminas, leucoflavinas, tetrahidropterinas y sulfito (Fridovich, 1998).

Las EROs pueden generarse a partir de procesos endógenos de los organismos, como la respiración celular y la fagocitosis, pero también mediante procesos exógenos (Gil del Valle *et al.*, 1999), como la radiación UV (Beckman y Ames, 1997), el metabolismo de xenobióticos (Martínez-Cayuela, 1998; Babu *et al.*, 2002) y eventos de isquemia-reperfusión (Gil del Valle *et al.*, 1999; Storey, 1996a; Willmore y Storey, 1996 y 1997; Zenteno-Savín, 2002). Los organismos cuentan con un sistema de defensa antioxidante encargado de controlar a las EROs (Gil del Valle *et al.*, 1999; Mittler, 2002; Livingstone, 2001).

Bajos niveles de EROs son indispensables para ciertos procesos bioquímicos involucrados en el señalamiento celular (Mittler, 2002). Sin embargo, la producción excesiva o inapropiada de EROs hace que se rompa su equilibrio con la producción de antioxidantes, lo cual puede desencadenar el “estrés oxidativo”. Este fenómeno puede tener efectos tóxicos al oxidar a moléculas básicas como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Gil del Valle *et al.*, 1999; Martínez-Cayuela, 1998), además, se sabe que la acumulación de EROs ocasiona muerte celular (Lotem *et al.*, 1996; Matés *et al.*,

1999; Halliwell y Gutteridge, 1999; Mittler, 2002). Lo anterior se traduce en daño a tejidos y por consiguiente en malfunciones metabólicas.

Las reacciones de las EROs pueden ser citotóxicas, alérgicas, mutagénicas y/o carcinogénicas (Mates *et al.*, 1999), por lo que se les ha visto relacionados con varias enfermedades y procesos como la arterioesclerosis, la diabetes, el envejecimiento, el SIDA y el cáncer (Mates *et al.*, 1999; Gil del Valle *et al.*, 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999; Johnson, 2002; Sastre *et al.*, 2003). Lo anterior hace ser al estrés oxidativo un buen indicador de la salud de los organismos.

1.1.1. Daño producido por las EROs

Las reacciones entre los radicales y moléculas no radicales tienen la característica de generar una reacción en cadena, como ocurre por ejemplo durante la oxidación de los lípidos poliinsaturados (PUFAs), abundantes en las membranas celulares (Fridovich, 1998). La peroxidación de lípidos es un mecanismo autocatalítico que conduce a la destrucción oxidativa de las membranas celulares (Çelik *et al.*, 2002), produciendo alteraciones en las funciones secretoras, en los gradientes iónicos (Gil del Valle *et al.*, 1999), e incluso la muerte celular.

En la mayoría de los casos, la peroxidación de lípidos inicia con la abstracción de un átomo de hidrógeno de un lípido insaturado por un radical libre (Fig. 2: 1), seguido de una compleja secuencia de reacciones propagativas en las cuales los PUFAs reaccionan con O₂ molecular (Fig. 2: 2) para formar hidroperóxidos (Fig. 7: 3), los cuales son degradados a productos aldehídicos (Fig. 2: 4) (Slater, 1984).

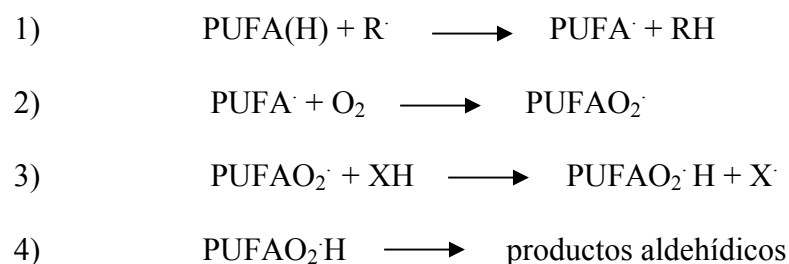


Figura 2. Peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Modificado de Slater, 1984).

Numerosos residuos químicos resultan de estas reacciones como metabolitos aldehídicos tóxicos y reactivos, de los cuales el malondialdehído (MDA) es el más importante (Çelik *et al.*, 2002; Gil del Valle *et al.*, 1999). El MDA puede difundir del sitio donde se produce y provocar edema, alterar la permeabilidad vascular, desencadenar la reacción inflamatoria y la quimiotaxis, estimular la fosfolipasa A₂ e inducir la liberación del ácido araquidónico con la subsecuente formación de eicosanoides (Gil del Valle *et al.*, 1999).

El MDA es de interés primario como producto de la peroxidación lipídica *in vivo*, y es un índice para la rancidez oxidativa en alimentos (Bird y Draper, 1984). En materiales biológicos el MDA existe en su forma libre y como complejo con varios constituyentes de los tejidos. Ha sido identificado también entre los productos de la descomposición oxidativa de amino ácidos, carbohidratos complejos, pentosas y hexosas formadas en la presencia de un metal, como producto de los radicales libres generado por la radiación ionizante *in vivo*, y es un producto de la biosíntesis de las prostaglandinas (Bird y Draper, 1984; Martínez-Cayuela, 1998). Sin embargo, se cree que la peroxidación de ácidos grasos (como el ácido araquidónico) es la fuente principal de MDA (Bird y Draper, 1984).

Debido a su interés como indicador de la peroxidación lipídica, varios métodos han sido propuestos para la evaluación del MDA en tejidos animales y vegetales (Bird y Draper, 1984; Slater, 1984).

1.2. Sistema Antioxidante

Los organismos han desarrollado defensas ante las EROs: moléculas antioxidantes que neutralizan, depuran o reparan los daños producidos (Simontacchi *et al.*, 2000). El sistema de defensa antioxidante incluye antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, los primeros corresponden a la primer barrera de defensa contra las EROS, mientras que los no enzimáticos incluyen vitaminas y péptidos que deben ser adquiridos mediante la dieta (Simontacchi *et al.*, 2000).

Los antioxidantes pueden actuar de diferente manera sobre las EROs:

- a) Prevenir: se trata de evitar la formación de EROs al secuestrar iones metálicos (ej. la mioglobina, albúmina, ceruloplasmina y transferrina) (en: Clayton, 2002).
- b) Depurar: transforman directamente a las EROs en moléculas menos dañinas como el agua (ej. enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y glutatión S-transferasa) (en: Gil del Valle *et al.*, 1999; Clayton, 2002).
- c) Neutralizar: inhiben la acción de las EROs oxidándose ellas mismas y dando lugar a sustancias inactivas. (ej. moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, las vitaminas C y E, melatonina, carotenoides y bilirrubina) (en: Gil del Valle *et al.*, 1999; Clayton, 2002).

- d) Reparar: sirve para remover las moléculas dañadas por las EROs (ej. glutatión peroxidasa, ADN polimerasa y fosfolipasas) (en: Gil del Valle *et al.*, 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999).

1.2.1. Enzimas Antioxidantes

Entre las enzimas que forman parte del sistema antioxidante se encuentran superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) (Halliwell y Gutteridge, 1999). En la siguiente figura (Fig. 3) se muestra el papel de cada una de ellas en el metabolismo oxidativo.

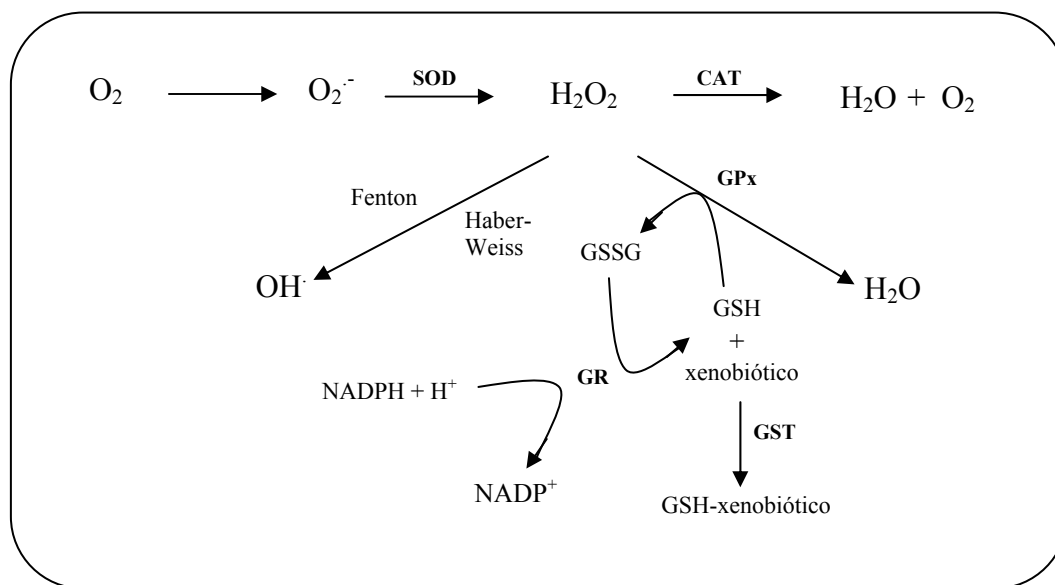
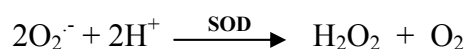


Figura 3. Metabolismo oxidativo: fuentes de generación y sistemas de eliminación de las EROs. O_2 = oxígeno, $O_2^{\cdot-}$ = radical superóxido, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, OH^{\cdot} = radical hidroxilo, SOD = superóxido dismutasa, CAT = catalasa, GPx = glutatión peroxidasa, GR = glutatión reductasa, GST = glutatión S-transferasa, GSSG = glutatión oxidado, GSH = glutatión reducido, NADPH = dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado reducido, $NADP^+$ = dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina, H^+ = protón, H_2O = agua (Modificado de Matés, 1999).

La superóxido dismutasa (E.C.1.15.1.1.) (SOD) es la primera defensa contra la toxicidad del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), protegiendo así a las células de sus efectos dañinos (Pippenger *et al.*, 1998). La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular:



(McCord y Fridovich, 1969).

La SOD, es una metaloproteína, y dependiendo del metal que contenga en su centro activo, se tienen 4 isoformas: CuZn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD y Ni-SOD (Fridovich, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999). Todos los eucariotes contienen abundante CuZn-SOD en el citoplasma, aunque también se presenta en el núcleo, lisosomas, entre las membranas mitocondriales e incluso hay una forma extracelular (EC-SOD). Esta enzima es homodimérica y los metales que contiene poseen diferente función; el cobre (Cu) actúa durante la catálisis, mientras que el zinc (Zn) se cree que tiene una función estructural (Fridovich, 1998). La CuZn-SOD se ha encontrado también en algunos procariotes (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La Mn-SOD se encuentra en bacterias, plantas y animales (Halliwell y Gutteridge, 1999), puede ser dimérica o tetramérica, contienen un manganeso (Mn III) por subunidad y se encuentra en la matriz mitocondrial y membrana plasmática de animales y levaduras. La ausencia de esta enzima en un organismo es letal. En *E. Coli*, normalmente no se encuentra, solamente se sintetiza cuando hay una exposición a aereación y a compuestos que incrementen la producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ (Fridovich, 1998). La Mn-SOD que se

encuentra en los procariotes es muy similar a la que se encuentra en las mitocondrias de eucariotes, lo cual apoya de cierta manera la teoría endosimbiótica. (Fridovich, 1998).

La Fe-SOD se encuentra en algunos procariotes y recientemente se ha descubierto en algunas plantas superiores (Halliwell y Gutteridge, 1999; Fridovich, 1998). La Fe-SOD tiene una secuencia muy relacionada con la Mn-SOD. Incluso, existen algunas SODs que pueden ser activas tanto con hierro (Fe) como por manganeso (Mn), dependiendo si las condiciones del medio son anaerobias o aerobias, respectivamente, estas enzimas son denominadas SODs cambialísticas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Fridovich, 1998). Por último, existe una SOD que contiene níquel (Ni-SOD), la cual ha sido descubierta recientemente en *Streptomyces griseus*, y se trata de una enzima homotetramérica (Fridovich, 1998).

Varios organismos anaerobios contienen SOD a pesar de que, aparentemente no la necesitan al no producir O_2^- , sin embargo, la presentan como una preparación que las previene a cualquier exposición con el O_2 (Fridovich, 1998).

La catalasa (E.C.1.11.1.6.) (CAT), es una enzima que sirve de protección a las células contra los efectos tóxicos del H_2O_2 , ya que cataliza la descomposición de ésta molécula a O_2 molecular y agua, sin producción de radicales libres (Aebi, 1984):



(Aebi, 1984).

La catalasa se presenta prácticamente en todos los organismos aerobios, y en cuanto a los animales, se encuentra ampliamente distribuida en sus tejidos (principalmente en los

peroxisomas) (Fridovich, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999; Boon *et al.*, 2001: página web: <http://www.clunet.edu/BioDev/omm/catalase/frames/cattx.htm#heme>) Esta enzima consiste de cuatro subunidades idénticas que van de 220,000 –a 350,000 kD, cada una de los cuales contiene un ferrihemo como grupo prostético en el centro catalítico (Fridovich, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999; Boon *et al.*, 2001: página web: <http://www.clunet.edu/BioDev/omm/catalase/frames/cattx.htm#heme>). Los monómeros de ciertas especies presentan además una molécula de NADP⁺ unida a cada monómero, protegiendo a la enzima de ser oxidada por su propio substrato (H₂O₂). La catalasa es de las enzimas más eficientes que se conocen, ya que presenta tasas de aproximadamente 200,000 eventos catalíticos por segundo por subunidad, lo cual es muy cercano al límite de difusión controlada (Boon *et al.*, 2001: página web: <http://www.clunet.edu/BioDev/omm/catalase/frames/cattx.htm#heme>).

La CAT puede también actuar en reacciones peroxidativas involucrando substratos que han donado iones hidrógeno, como por ejemplo el metanol, etanol ácido fórmico y fenoles (Aebi, 1984; Fridovich, 1998):



(Aebi, 1984).

Los niveles elevados de H₂O₂ pueden conllevar a un exceso de OH[•] mediante las reacciones de Fenton (Fe/Cu) y Haber-Weiss en las que intervienen metales (Fig. 4) . Al no existir enzimas que regulen al potente OH[•], la CAT se convierte entonces en una enzima muy importante en el estrés oxidativo (Pippenger *et al.*, 1998).

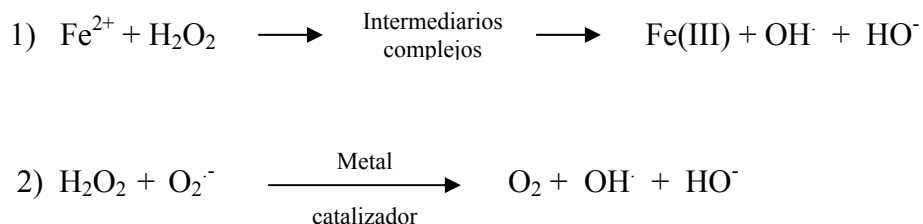
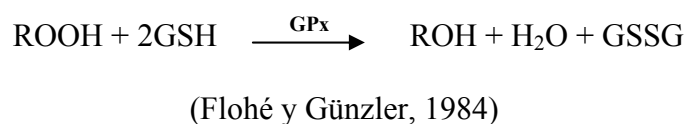
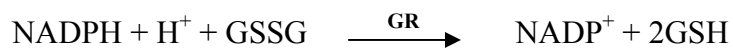


Figura 4. 1) Reacción de Fenton. 2) Reacción de Haber-Weiss (Modificado de Halliwell y Gutteridge, 1999).

La glutatión peroxidasa (E.C.1.11.1.9) (GPx) es una selenoenzima que se encuentra en la fracción mitocondrial y citoplásmica de las células. Esta enzima al igual que la CAT hidroliza el H_2O_2 , pero solamente a bajas concentraciones, por lo que se piensa que se trata más bien de una enzima reguladora, y no detoxificadora (como la CAT) (Mittler, 2002). Primeramente, GPx actúa en los hidroperóxidos lipídicos que son liberados de los fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A2, produciendo glutatión oxidado (GSSG) y alcoholes (Flohé y Günzler, 1984). La GPx puede utilizar también como substratos a los hidroperóxidos de colesterol (Kawamura, 2000):

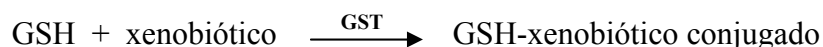


La glutatión reductasa (E.C.1.6.4.2.) (GR) es una flavoproteína que regresa al GSSG a su estado reducido (glutatión reducido, GSH) utilizando una molécula de NADPH como agente reductor. Esta molécula es esencial para mantener los niveles de GSH (Carlberg y Mannervik, 1985):



(Carlberg y Mannervik, 1985).

Las glutatión S-transferasas (E.C.2.5.1.18) (GST) se localizan en el citoplasma, núcleo y superficie celular y son agrupadas en cinco clases: Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Teta (θ) y Sigma (σ) (Tsuchida, 2000). Tienen un peso molecular de 45 000 y se disocian en subunidades de aproximadamente 25 000 daltones (Habig *et al.*, 1974). El papel de las GSTs es iniciar la detoxificación de agentes alquilantes potenciales, incluyendo compuestos farmacológicamente activos y xenobióticos (Habig y Jakoby, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1999). Estas enzimas catalizan la reacción de dichos compuestos con el grupo -SH del GSH (nucleófilo), neutralizando así sus sitios electrofílicos y volviendo los productos más solubles en agua (Habig y Jakoby, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1999):



(Habig y Jakoby, 1981).

En el hígado se encuentran elevados niveles de GST y algunos de los conjugados de glutatión son frecuentemente excretados a la bilis (Halliwell y Gutteridge, 1999). Alternativamente, los conjugados de glutatión son metabolizados posteriormente por ruptura de los residuos de glutamato y glicina, seguidos de la acetilación del grupo amino resultante del residuo de cisteína, para producir ácido mercaptúrico, el cual es excretado mediante la orina (Habig *et al.*, 1974; Halliwell y Gutteridge, 1999). Algunas formas de GSTs tienen actividad de peroxidasa selenio-independiente en hidroperóxidos orgánicos,

resultado de la peroxidación de lípidos (Tsuchida, 2000; Kawamura, 2000). Sin embargo, a diferencia de la GPx, la GST no actúa con el peróxido de hidrógeno (Kawamura, 2000).

Además de su actividad catalítica, estas enzimas son conocidas como “ligandinas”, ya que son proteínas acarreadoras de un gran número de compuestos (como la bilirrubina, esteroides, y otros) (Habig y Jakoby, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1999). Las GST son consideradas como biomarcadores de la susceptibilidad al cáncer, ya que se conoce que formas moleculares de esta enzima se expresan en células preneoplásicas y neoplásicas (Stegeman *et al.*, 1992; Tsuchida y Sato, 1992).

1.3. Biología de las Tortugas Marinas

1.3.1. Taxonomía y Especies de Tortugas Marinas

Existen siete especies de tortugas marinas en el mundo, agrupadas todas en dos familias; la Dermochelyidae, en la cual se ubica *Dermochelys coriacea* (tortuga laúd o siete filos), y la familia Cheloniidae, la cual incluye a *Chelonia mydas* (tortuga verde, negra, blanca), *Caretta caretta* (tortuga amarilla, caguama, jabalina, cabezona, perica, boba), *Eretmochelys imbricata* (tortuga carey), *Lepidochelys olivacea* (tortuga golfina), *Lepidochelys kempii* (tortuga lora), *Natator depressus* (tortuga espalda plana). Todas ellas pertenecientes al suborden Cryptodira, orden Testudines, la subclase Anápsida, dentro de la clase de los reptiles (Pritchard, 1997; Pritchard y Mortimer, 2000; Márquez, 2002).

1.3.2. Características Generales

Las tortugas, junto con las lagartijas, las serpientes y los cocodrilos forman el grupo de los reptiles, ya que tienen en común algunas características. Son organismos vertebrados de respiración pulmonar, poiquiloterms (Márquez, 2002), aunque actualmente se sabe que las tortugas marinas pueden regular su propia temperatura mediante la luz solar y el flujo sanguíneo (Spotila *et al.*, 1997). Los reptiles tienen la piel seca, desprovista casi totalmente de glándulas y cubierta por escamas córneas, lo que les permite abandonar el medio acuático sin peligro al desecamiento. Los reptiles pierden la piel periódicamente, evento que en el caso de las tortugas se manifiesta como una descamación continua (Márquez, 2002). La reproducción es por medio de huevos con cáscara ligera o completamente calcificada (Márquez, 2002).

Una de las características que separa a las tortugas del resto de los reptiles es la presencia de una concha que encierra el cuerpo, la cual, está formada dorsalmente por el carapacho y ventralmente por el plastrón, unidos firmemente por los puentes. La concha está constituida por placas óseas, arregladas en forma de mosaico, que por arriba forman una bóveda, generalmente cubierta por escudos córneos. Los huesos de las costillas y vértebras se fusionan dorsalmente al carapacho, y tanto la cintura pélvica como la escapular se han adaptado de tal manera que presentan una morfología muy peculiar. Las aletas de las tortugas marinas tienen los dedos unidos y muy largos, a manera de remos, con una o dos uñas reducidas (Márquez, 2002).

1.4. Tortuga Verde *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758)

1.4.1. Distribución

Las tortugas verdes se localizan en las zonas tropicales y subtropicales (entre las latitudes de 40° N - 40° S) de los océanos Atlántico, Pacífico e Índico (Plotkin, 2003), por lo que se puede decir que su distribución es circumbol. Las tortugas verdes presentan morfo-especies, ya que se encuentran formadas por diferentes poblaciones y metapoblaciones que se nombran de acuerdo a su zona principal de anidación (U.S. Fish and Wildlife Service, 1997).

1.4.2. Ciclo de Vida

Las tortugas marinas son organismos longevos de crecimiento lento. El ciclo de vida de estos organismos es complejo y comprende diversas migraciones y utilización de diversos ecosistemas, incluyendo hábitats terrestres (playas de anidación), donde las hembras depositan sus huevos y en donde se lleva a cabo el desarrollo embrionario. También emplean zonas costeras (zona nerítica) donde se alimentan, terminan su desarrollo y se reproducen, y por último, el mar abierto (zona oceánica), al cual las crías se dirigen después de eclosionar para pasar ahí sus primeros 5 a 20 años de vida, antes de dirigirse a las playas de alimentación (Bolten, 2003; U.S. Fish and Wildlife Service, 1997) (Fig. 5).

Los hábitos alimenticios de las tortugas marinas son diferentes dependiendo de su ontogenia y, por lo tanto, del hábitat que ocupen (U.S. Fish and Wildlife Service, 1997). Las crías y juveniles son omnívoros, y se alimentan de macroinvertebrados y algas, mientras que los adultos son herbívoros, alimentándose principalmente de pastos marinos

(*Zoostera marina*, *Thalassia* sp., *Phyllospadix* sp.) y macroalgas (*Gracilaria* sp., *Caulerpa* sp., *Codium* sp. *Sargassum* sp.) (Mortimer, 1995; Bjorndal, 1997; Seminoff *et al.*, 2002; López-Mendilaharsu, 2002).

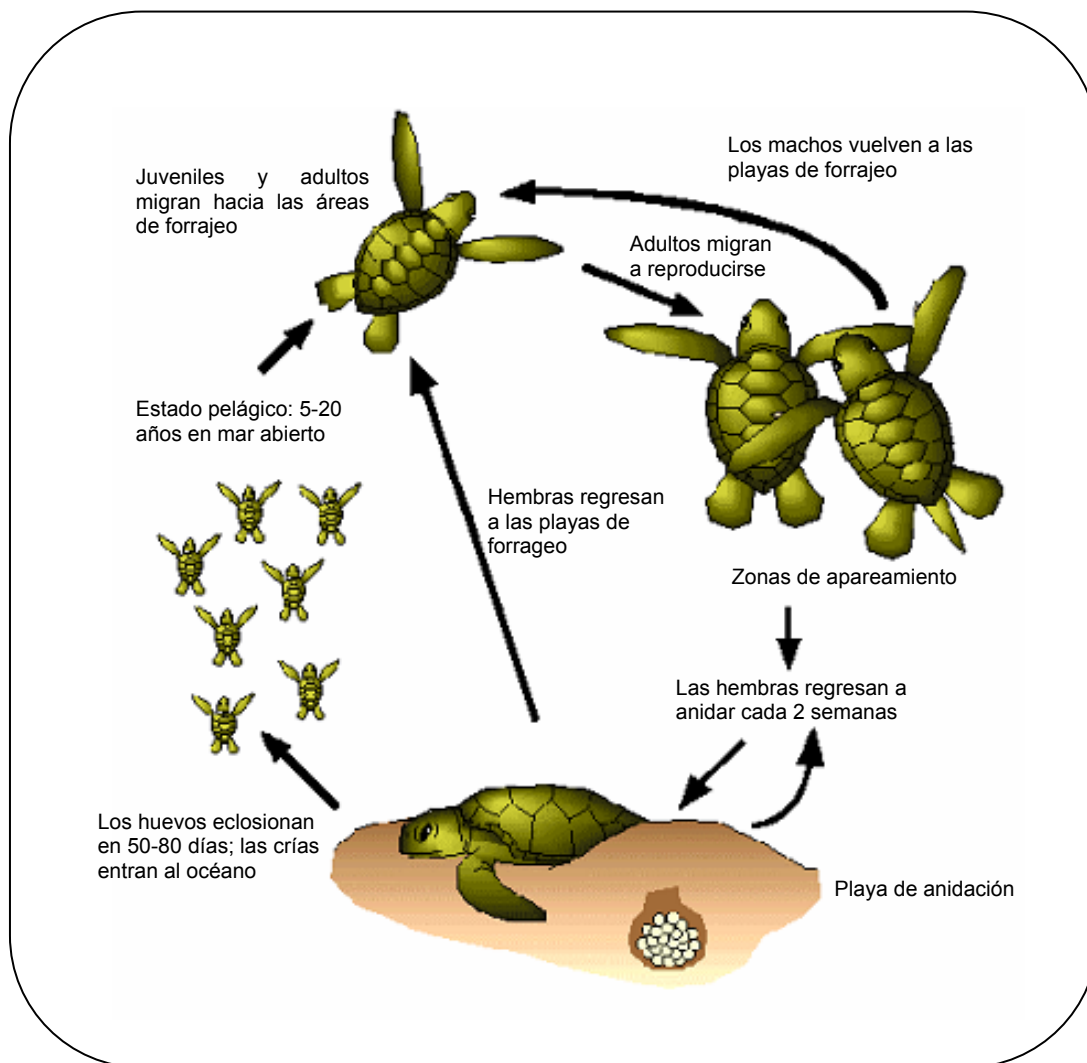


Figura 5. Ciclo de vida de las tortugas marinas (modificado de la página web de la University of North Carolina Chapel Hill: www.unc.edu/depts/oceanweb/turtles/lifecycle2.gif).

1.4.3. Estatus Taxonómico

Actualmente existe una controversia en cuanto a la categoría taxonómica de las tortugas verdes del Pacífico oriental (localmente conocidas como tortugas negras), las cuales presentan algunas diferencias morfológicas con respecto a otras poblaciones de tortugas verdes (coloración oscura, menor tamaño, morfología del cráneo, aislamiento geográfico) (Fig. 6) (Bowen y Karl, 1997 y 1999; Pritchard, 1999), por lo que, varios autores apoyan la idea de que se le reconozca como una especie diferente (*Chelonia agassizii*) (Pritchard y Trebbau, 1984; Márquez, 1990; Alvarado y Figueroa, 1990; Pritchard, 1997). Sin embargo, los estudios genéticos utilizando ADN mitocondrial y nuclear no soportan la separación evolutiva de *Chelonia agassizii* (Bowen y Karl, 1999). Otros autores le atribuyen la categoría de subespecie (*Chelonia mydas agassizii*) (Kamezaki y Matsui, 1995; Pritchard, 1997; Bowen y Karl, 1997; Pritchard y Mortimer, 2000). En este estudio se refirió a las tortugas negras o tortugas verdes del Pacífico oriental como subespecie de *Chelonia mydas*.

1.4.4. Morfología

Las tortugas verdes se caracterizan por tener un caparazón oval (Fig. 7A), y en el caso de las tortugas negras, en forma de corazón y con una escotadura posterior en adultos (Fig. 7B). El caparazón no es aserrado y presenta cuatro pares de escudos costales (Fig. 7A y B). La longitud recta del carapacho (LRC) alcanza hasta 120 cm, aunque la población del Pacífico oriental únicamente llega a medir 90 cm. La cabeza es anteriormente redondeada, con un par de escamas prefrontales y tres o cuatro pares de escamas postorbitales (Fig. 7C). Las tortugas verdes tienen una uña en cada aleta. Las crías tienen el dorso color negro, el

cual puede permanecer así o transformarse en los adultos. Ventralmente las crías son blancas. Las tortugas verdes pueden pesar hasta 230 kg, sin embargo, en el Pacífico oriental solamente alcanzan hasta 120 kg. (Pritchard y Mortimer, 2000).



Figura 6. La tortuga negra *Chelonia mydas agassizii* (Foto: James Greig).

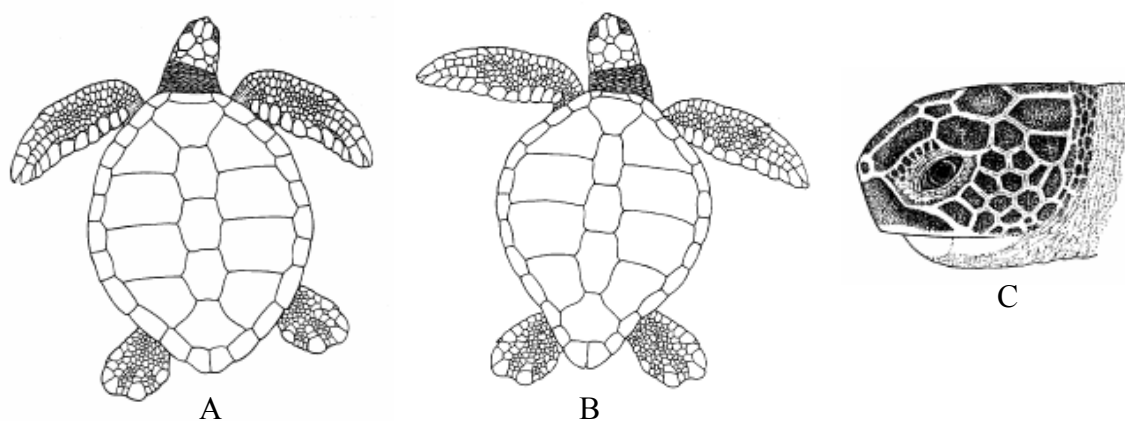


Figura 7. A) Morfología externa de la tortuga verde; caparazón ovalado, B) Morfología externa de la tortuga negra; caparazón en forma de corazón, C) Cabeza. (Modificado de Pritchard y Mortimer, 2000).

1.4.5. Estado de Conservación

Históricamente, las tortugas marinas fueron sumamente abundantes en todas las regiones donde se distribuyen. Estos reptiles aparecieron en la tierra hace más de 150 millones de años (Márquez, 2002; Fraizer, 2003). Sin embargo, actualmente se presenta una creciente preocupación por el descenso en el número de tortugas de las siete especies existentes, de manera que, desde 1981, todas ellas se encuentran bajo la categoría de “amenazadas o en peligro de extinción” en el apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies (CITES) (U.S. Fish and Wildlife Service, 1997).

La tortuga verde *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Fig. 1), incluyendo todas sus poblaciones, se encuentra bajo la categoría de especie en “peligro de extinción” (EN-A1 abd) acorde a los lineamientos de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (National Marine Fisheries Service y U.S. Fish and Wildlife Service, 1998), y también de acuerdo a la clasificación de la norma oficial mexicana NOM-059-ECOL-2001 (Diario Oficial de la Federación, 2002).

Las causas del decremento en sus poblaciones han sido principalmente antropogénicas, como el saqueo de nidos, la sobreexplotación (para consumo de carne y utilización de la concha, del aceite y la piel), colisiones con embarcaciones, la captura incidental en redes de pesca, la contaminación, y la destrucción del hábitat (Eckert, 1995; Lutcavage *et al.*, 1997; Boulon, 2000; Gardner y Nichols, 2001). No obstante, los factores de muerte natural, como la amenaza de los depredadores y las enfermedades, no han dejado de ejercer acción en las poblaciones (Stancyk, 1995; Herbst y Jacobson, 1995).

1.5. Fibropapilomatosis (FP)

La FP es una enfermedad epidémica de tortugas marinas, primeramente descrita en tortugas verdes (Smith y Coates, 1939), aunque actualmente se ha reportado en las demás especies: tortugas amarillas (Herbst, 1994), golfinas (Aguirre *et al.*, 1999), loras (Harshbarger, 1991), carey en cautiverio (D'Amato y Morales-Neto, 2000), laúd (Huerta *et al.*, 2002) y en espalda plana (Milton y Lutz, 2003). Las poblaciones de Florida (33 a 61%, 1986-90; Balazs, 1991) y Hawaii (49 a 92%, 1989-90; Balazs, 1991) son las más afectadas actualmente. La FP se ha reportado en todos los océanos donde habita la tortuga verde (Herbst, 1994); sin embargo, en las costas de Baja California, no se ha reportado la presencia de dicha enfermedad en las poblaciones de tortugas marinas.

Las tortugas afectadas presentan debilidad, inanición y anemia. Los tumores se presentan frecuentemente en piel, ojos, cavidad oral y carapacho, así como en órganos viscerales como hígado, pulmones, riñones y tracto gastrointestinal (Aguirre *et al.*, 1994b) (Fig. 8). Los tumores cutáneos pueden interferir con la visión, pueden truncar severamente la capacidad de las tortugas para nadar y bucear, y por lo tanto, para escapar de los depredadores, además, se ven imposibilitadas de localizar, capturar y comer su alimento. Los tumores internos pueden afectar la función de los órganos, la digestión (obstrucción del intestino), flotación, función cardíaca y respiración, e inducir fallas renales, y necrosis de los tejidos afectados. Lo anterior afecta la vida de los organismos, a pesar de que este tipo de tumores es considerado como benigno (Herbst, 1994; Work y Balazs, 1999).

Aunque la etiología precisa del FP todavía se encuentra bajo estudio, la enfermedad ha sido asociada a varios factores como la inmunosupresión por contaminantes, parásitos, radiación solar, estrés, predisposición genética (Aguirre *et al.*, 1994a y b; Dailey y Morris,

1995; Aguirre *et al.*, 1998), y biotoxinas (Landsberg, 1999). Por otra parte, se han asociado 3 tipos de virus con los tumores; papilomavirus (Lu *et al.*, 2000), herpesvirus (Jacobson *et al.*, 1991; Lackovich *et al.*, 1999), y retrovirus (Casey *et al.*, 1997), no obstante, ninguno de ellos se ha comprobado que sea el factor etiológico primario causante de la transmisión de la FP. Existe también un sinergismo entre la FP y la espiroquidiasis; muchos animales presentan las dos infecciones simultáneamente (Aguirre *et al.*, 1998).

Habiéndose asociado el estrés oxidativo con el cáncer (aparición de tumores y mutagénesis) (Halliwell y Gutteridge, 1999; Mantovani *et al.*, 2002), en el presente estudio se hizo una comparación, en términos de metabolismo oxidativo, de tortugas marinas saludables y con tortugas con FP.



Figura 8. Fibropapilomas externos en tortugas verdes. (Modificado de la página web del College of Veterinary Medicine, Florida University: www.vetmed.ufl.edu/sacs/wildlife/photos/GTFibro).

2. ANTECEDENTES

2.1. Bioquímica Sanguínea de Tortugas Verdes

Los perfiles sanguíneos para tortugas verdes enfermas (con FP) han sido reportados anteriormente (Norton *et al.*, 1990; Bolten y Bjorndal, 1992; Aguirre *et al.*, 1995) y en ellos es notable el esfuerzo para evaluar las consecuencias bioquímicas de los FP en tortugas verdes, es decir, los estudios realizados giran en torno a parámetros bioquímicos que sirven para diagnosticar el estado de salud de los organismos. Gran parte de estos estudios se han llevado a cabo en organismos de Bahía Kanehoe, Isla Oahu en Hawaii, E.U.A., sitio en donde se reporta una prevalencia de FP que va de 49-92% desde febrero de 1989 (Balazs, 1991), y de donde se obtuvieron las muestras de tortugas enfermas para este estudio.

Aguirre *et al.* (1995) reportan los niveles basales de la bioquímica adrenocortical, hematológica y plasmática para tortugas verdes juveniles clínicamente sanas, cuyos valores comparan con los de otro grupo de tortugas verdes con FP. En este estudio se concluye que las tortugas con FP se encuentran bajo estrés crónico e inmunosuprimidas; la inmunosupresión es atribuida a los elevados niveles de corticosterona, elevadas tasas de heterófilos/linfocitos (H/L) y neutrofilia. Los valores elevados de corticosterona se asocian al estrés producido por captura y manipulación (Aguirre *et al.*, 1995).

Se han encontrado diferencias significativas en los valores de proteínas totales, nitrógeno de urea en sangre, y valores enzimáticos entre tortugas sanas y tortugas con FP. Las tortugas con FP más avanzado presentaron hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipoferrinemia, azotanemia y bajos niveles de colesterol y triglicéridos, además de tasas

inversas de calcio/fósforo. Los mismos autores confirman la evidencia de estrés crónico e inmunosupresión en tortugas con FP, y además afirman que las variables como la edad, sexo, dieta y cambios estacionales también influyen en los parámetros sanguíneos (Aguirre y Balazs, 2000). Por otra parte, Work *et al.* (2000) estudiaron la respuesta inmune humoral y celular de tortugas verdes de Hawaii, y sugieren que la inmunosupresión de las tortugas con FP es una secuela de la enfermedad más que un factor de predisposición.

Swimmer (2000) evaluó algunos parámetros sanguíneos en tortugas marinas silvestres y cautivas, ambos grupos con y sin FP, encontrando efectos sinérgicos entre la enfermedad y el cautiverio. En general, las tortugas sanas en cautiverio presentaron niveles más elevados de corticosterona que las tortugas silvestres, y las tortugas cautivas con FP presentaron niveles más elevados de fosfatasa alcalina y muy bajos de lactato en comparación con las sanas. Swimmer (2000) sugiere utilizar un análisis multivariado con diferentes parámetros bioquímicos para averiguar cuáles de ellos pudieran utilizarse de manera precisa para predecir si las tortugas se encuentran sanas o están siendo afectadas por FP.

Work y Balazs (1999) relacionaron el estatus hematológico de las tortugas con FP y el grado de severidad de la enfermedad (FP score severity: FPS). Encontraron que los heterófilos y monocitos tuvieron un incremento progresivo con respecto al FPS, por el contrario, el hematocrito, sólidos totales, linfocitos, basófilos, eosinófilos y glóbulos blancos totales disminuyeron conforme se acrecentaba el FPS.

2.2. Varios Aspectos del Metabolismo Oxidativo

2.2.1. Daño al ADN y Cáncer

Cualquier agente capaz de modificar químicamente el ADN es considerado como carcinógeno, y las EROs caen dentro de esta categoría, ya que pueden deteriorar al ADN de diferentes maneras: mediante un ataque químico directo, afectando las bases (por ej. la formación de 8-OHdG) o rompiendo las cadenas de ADN, para lo cual, el O_2^- y el H_2O_2 no actúan directamente sobre la molécula de ADN, sino que lo hacen mediante la formación del $OH\cdot$ a partir de ellos (Ahmad *et al.*, 1998; Klungland *et al.*, 1999). También existen mecanismos indirectos de daño, como la activación de las endonucleasas dependientes de Ca^{2+} o la interrupción de las enzimas que replican o reparan el ADN (Rossman y Goncharova, 1998). Estos eventos desencadenan los procesos que dan lugar a la muerte celular, o bien, facilitan la aparición de mutaciones que pueden dar inicio al proceso de carcinogénesis (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los múltiples efectos de las EROs sugieren que puedan contribuir a la carcinogénesis en todos sus estados, cualquiera que sea el carcinógeno que haya iniciado el proceso (Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.2.2. Biomarcadores

Varios autores han utilizado el metabolismo oxidativo para evaluar los daños producidos a diferentes organismos por agentes altamente oxidantes. Estos estudios se han llevado a cabo principalmente en organismos acuáticos con el fin de desarrollar biomarcadores que permitan detectar condiciones de estrés ambiental.

Así por ejemplo, Downs *et al.* (2001) desarrollaron un sistema de biomarcadores moleculares (incluyendo los niveles de GSH, peroxidación de lípidos y Mn-SOD) para detectar cambios en camarones *Palaeomonetes pugio*, después de haberlos expuesto a estrés térmico, cadmio, atrazina y diesel. Algo similar hicieron Pedrajas *et al.* (1995) con el pez *Sparus aurata*, al exponerlo a diferentes metales de transición y xenobióticos orgánicos, encontrando además de diferentes patrones de respuesta (en términos de estrés oxidativo), una forma oxidada de CuZn-SOD como potencial biomarcador. Çelik *et al.* (2002) utilizaron el malondialdehído (MDA) como biomarcador de la toxicidad por factores de crecimiento vegetal (carcinógenos) en animales.

Regoli y Winston. (1999) desarrollaron la técnica TOSC (total oxidant scavenging capacity), la cual permite evaluar la capacidad antioxidante total de los organismos ante diferentes EROs como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), el peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y el peroxinitrito (HOONO). Por otra parte, Frenzilli *et al.* (2001) en un estudio realizado en *Mytilus galloprovincialis* provenientes de una laguna altamente eutroficada, encontraron que estos organismos presentaban una baja integridad del ADN (ensayo Cometa) debida a las EROs, ya que los niveles de TOSC fueron muy bajos.

Varios autores sugieren que la cuantificación de la 8-OHdG, es un eficiente biomarcador del daño oxidativo al ADN provocado por EROs (Klungland *et al.*, 1999; Shen y Ong, 2001). A su vez, se propone que la frecuencia de alelos de p53 mutados en tejidos humanos no tumorales puede ser un biomarcador del daño por EROs para identificar a organismos con un elevado riesgo de presentar cáncer (Hussain *et al.*, 2002).

Stegeman *et al.* (1992) afirman que la GST puede modular la susceptibilidad de diferentes especies a los carcinógenos químicos, como los hidrocarburos aromáticos

policíclicos (PAH), los bifenilos policlorados (PCBs) y las aminas aromáticas A su vez, Tsuchida y Sato (1992) encontraron que en células preneoplásicas y neoplásicas, se expresan formas moleculares específicas de GST, particularmente la forma GST- π , la cual sugieren como biomarcador de carcinogénesis química. También se ha utilizado la GST- π como biomarcador de preneoplasias producidas por el ácido okadáico, que es un promotor de tumores (Sueoka y Fujiki, 1997), y se sabe que es producido por el dinoflagelado *Prorocentrum sp.* mismo que se ha visto relacionado con la FP de tortugas verdes (Landsberg, 1999).

2.2.3. Estudios en Reptiles

Pocos han sido los estudios de estrés oxidativo en reptiles, entre ellos se encuentra el realizado por Hermes-Lima y Storey (1993), quienes evaluaron el sistema antioxidante en la serpiente *Thamnophis sirtalis* después de una exposición a bajas temperaturas. Por otra parte, Willmore y Storey (1996, 1997) estudiaron la correlación entre la tolerancia a la anoxia y el estrés oxidativo en tortugas de agua dulce (*Trachemys scripta elegans*).

2.2.3.1. Tortugas Marinas

Específicamente en tortugas marinas, el único estudio relacionado con el metabolismo oxidativo del cual se tiene registro es el que realizó Nakamura (1980). En dicho trabajo se evaluaron los carotenoides totales en el suero de *Chelonia mydas* del Pacífico, encontrando una concentración de 1.27 $\mu\text{g/mL}$. Lo cual es un valor de referencia para futuros estudios.

3. JUSTIFICACIÓN

Las poblaciones de tortugas marinas se encuentran actualmente en peligro de extinción por lo que es necesario desarrollar un sistema de biomarcadores que permita evaluar la condición física de estos organismos, siendo el metabolismo oxidativo una alternativa. El realizar una evaluación del metabolismo oxidativo en tortugas marinas nos permite conocer el daño oxidativo y los niveles de antioxidantes basales en estos organismos, lo cual se puede utilizar como punto de comparación para tener un mejor entendimiento de las alteraciones fisiológicas que pueden sufrir las tortugas marinas que se encuentran bajo algún tipo de estrés.

La fibropapilomatosis (FP) es una enfermedad presente en proporciones epizoóticas en varias poblaciones de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) en el mundo, por lo tanto, es importante hacer estudios en los que se busquen posibles correlaciones de la FP con factores que nos permitan comprender mejor esta enfermedad. Siendo la FP una enfermedad neoplásica, y al estar éstas relacionadas con el estrés oxidativo, este último se vuelve una herramienta interesante para el estudio de la FP.

4. HIPÓTESIS

El metabolismo oxidativo de las tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*) presenta un patrón semejante al encontrado en otros reptiles. Además, los parámetros que constituyen el metabolismo oxidativo presentan variaciones debidas a factores bióticos (sexo, edad) y abióticos (localidad, estación del año) en tortugas negras y verdes. Este proceso puede ser utilizado para evaluar la salud de las poblaciones de tortugas marinas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el metabolismo oxidativo en diferentes tejidos y sangre de tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*), así como evaluar su utilidad como biomarcador de FP.

5.2. Objetivos particulares

Evaluar la producción de radical superóxido ($O_2\cdot^-$) como indicador de la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs) en tejidos de tortugas marinas.

Cuantificar los niveles de peroxidación de lípidos como indicadores del daño generado por EROs en tejidos de tortugas marinas.

Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST), como indicadores de las defensas contra EROs en tejidos y sangre de tortugas marinas.

Comparar los resultados entre grupos de edades, sexo, estación del año, localidad y FPS en que se realizaron los muestreos.

Comparar los resultados de tortugas marinas saludables con tortugas que presenten tumoraciones/neoplasias.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de Estudio

El presente estudio se llevó a cabo en dos poblaciones diferentes de *Chelonia mydas*., una procedente de las playas de del Pacífico oriental en la península de Baja California, México (Figs. 9 y 11), y una procedente de dos localidades de las Islas de Hawaii en de Hawaii, E.U.A. (Figs. 10 y11).

6.1.1. Península de Baja California, México

La península de Baja California (Fig. 9) se encuentra localizada al noroeste de México, ubicada entre el Golfo de California y el Océano Pacífico. Tiene una longitud aproximada de 1.225 km, y su anchura varía de 48 a 300 km (Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta®, 2003), por lo cual sus características son similares a las de una isla (Nieto-Garibay, 1999). La península es recorrida por un sistema montañoso y una planicie costera, además, cuenta con una cadena de islas. En su litoral hay grandes reservas pesqueras y asentamientos de reproducción de mamíferos marinos, como ballenas, delfines y focas (Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta®, 2003).

La costa occidental de Baja California tiene la influencia de una corriente marina fría que tiene efectos sobre el clima local, el cual es muy árido o seco desértico, con una temperatura media anual de 18-22°C, lluvias en los meses fríos y una humedad relativa del 50%. En la península domina la vegetación xerófila, aunque en los extremos norte y sur se

encuentran algunos bosques de coníferas, y en el sur existe un bosque tropical caducifolio (Nieto-Garibay, 1999).

El Golfo de California y la costa del Pacífico de Baja California se consideran los principales sitios de alimentación y desarrollo de la tortuga negra (Cliffon *et al.*, 1995; Gardner y Nichols, 2001). La población de tortugas negras (Pacífico oriental) se distribuye desde las costas de California, E.U.A., hasta el sur de Perú (Márquez, 2002), teniendo sus principales áreas de anidación en Colola y Maruata, Michoacán, México (Cliffon *et al.*, 1995; U.S. Fish and Wildlife Service, 1997), aunque también anidan en las Islas Revillagigedo, México, en Costa Rica y en las Islas Galápagos, Ecuador (López-Mendilaharsu, 2002) (Fig. 11A).

6.1.2. Hawaii, E.U.A.

El archipiélago hawaiano consiste de 32 islas, isletas y arrecifes (de 18°54'N, 154°40'W a 28°15'N, 178°20'W) (Fig.10), ocho de las cuales se encuentran habitadas y son las principales: Hawaii, Maui, Kahoolawe, Lanai, Molokai, Oahu, Kauai, Niihau). Estas islas comprenden aproximadamente el 99% (16,650 km²) del total de tierra del área, lo restante son isletas que se encuentran al noroeste de las islas Kauai y Niihau, y constituyen, a excepción de las islas Kure y Midway, el Refugio Nacional para la Vida Silvestre de las Islas de Hawaii (Balazs, 1995a).

Las islas hawaianas son de origen volcánico y extremadamente montañosas. Hawaii en general tiene un clima tropical moderado. La temperatura media anual es de 23.9°C y varía poco entre los meses de verano e invierno. A pesar de las fuertes precipitaciones, la escasez de escorrentía no permite la formación de lagos y ríos

(Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta®, 2003; Wikipedia: <http://es.wikipedia.org/wiki/Hawaii>).

Oahu, es una isla central de Hawaii, ubicada entre las islas Kauai y Molokai (Fig. 11A); Oahu mide unos 64 km de longitud y 42 km de anchura, con una superficie de 1.555 km². La isla es el centro comercial de Hawaii e importante punto del sistema defensivo de los Estados Unidos en el Pacífico (Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta®, 2003).

Kanehoe es la bahía más grande de las islas Hawaiianas, y comprende un importante sitio de forrageo y descanso para las tortugas verdes (Balazs, 1991). La población de Hawaii tiene su zona principal de anidación en French Frigate Shoals, y se extiende únicamente en torno al Archipiélago Hawaiiano (Balazs, 1995a y b) (Fig. 11B).

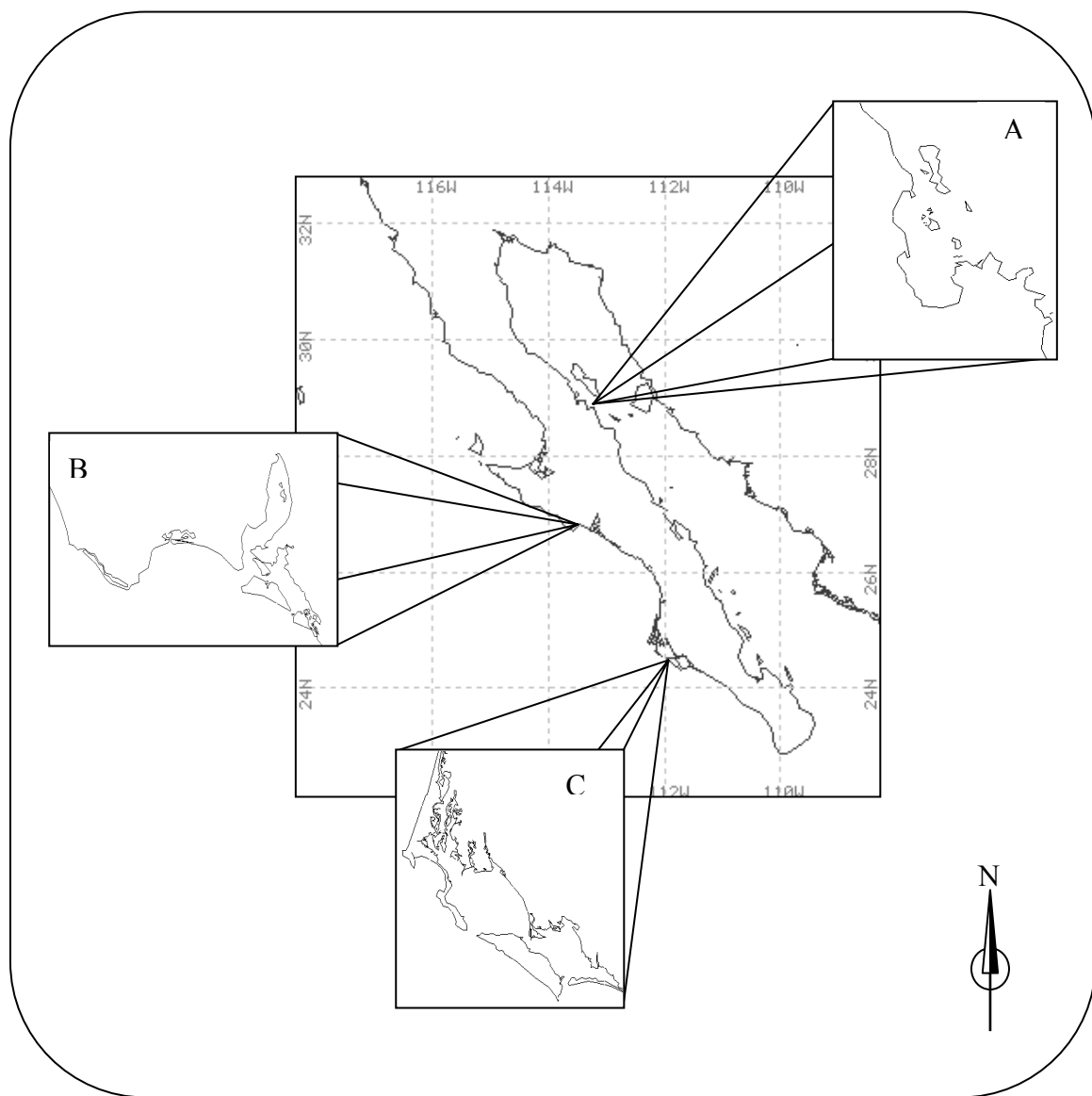


Figura 9. Zonas de muestreo en Baja California, México: A) Bahía de Los Ángeles, B.C.N. ($28^{\circ} 59' \text{ LN}$, $113^{\circ} 32' \text{ LO}$), B) Punta Abreojos, B.C.S. ($26^{\circ} 49' \text{ LN}$, $113^{\circ} 26' \text{ LO}$), C) Bahía Magdalena, B.C.S. ($24^{\circ} 38' \text{ LN}$, $111^{\circ} 58' \text{ LO}$) (Modificado de la página web de Signell R. en la NOAA/NGDC: <http://rimmer.ngdc.noaa.gov/coast/>; Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta®, 2003).

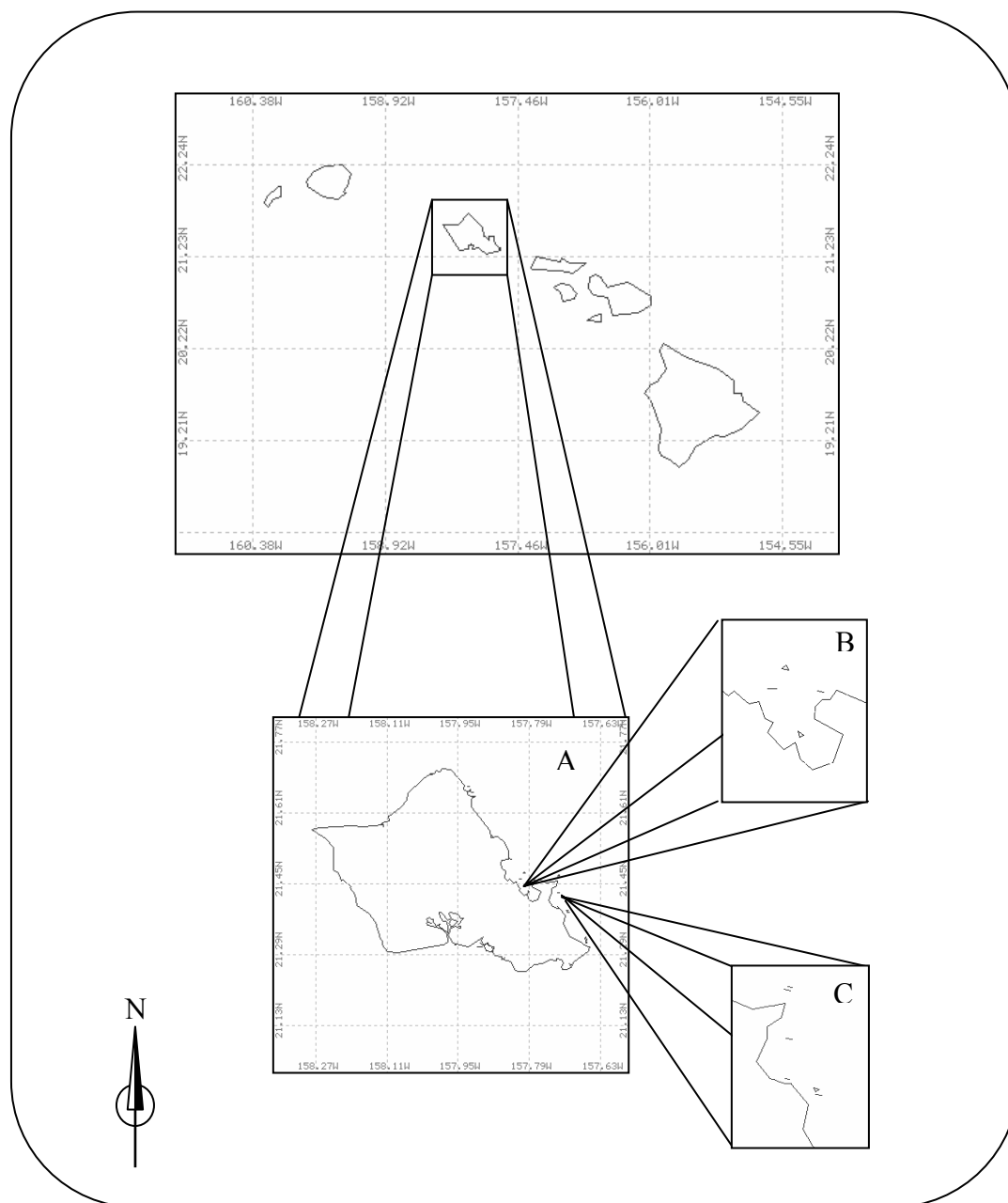


Figura 10. Zona de estudio en Hawaii: A) Isla Oahu, B) Bahía Kaneohe ($21^{\circ} 30''$ LN, $157^{\circ} 50''$ LO), C) Bahía Kailua ($21^{\circ} 24'$ LN, $157^{\circ} 43'$ LO). (Modificado de la página web de Signell R. en la NOAA/NGDC: <http://rimmer.ngdc.noaa.gov/coast/>; Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta®, 2003).

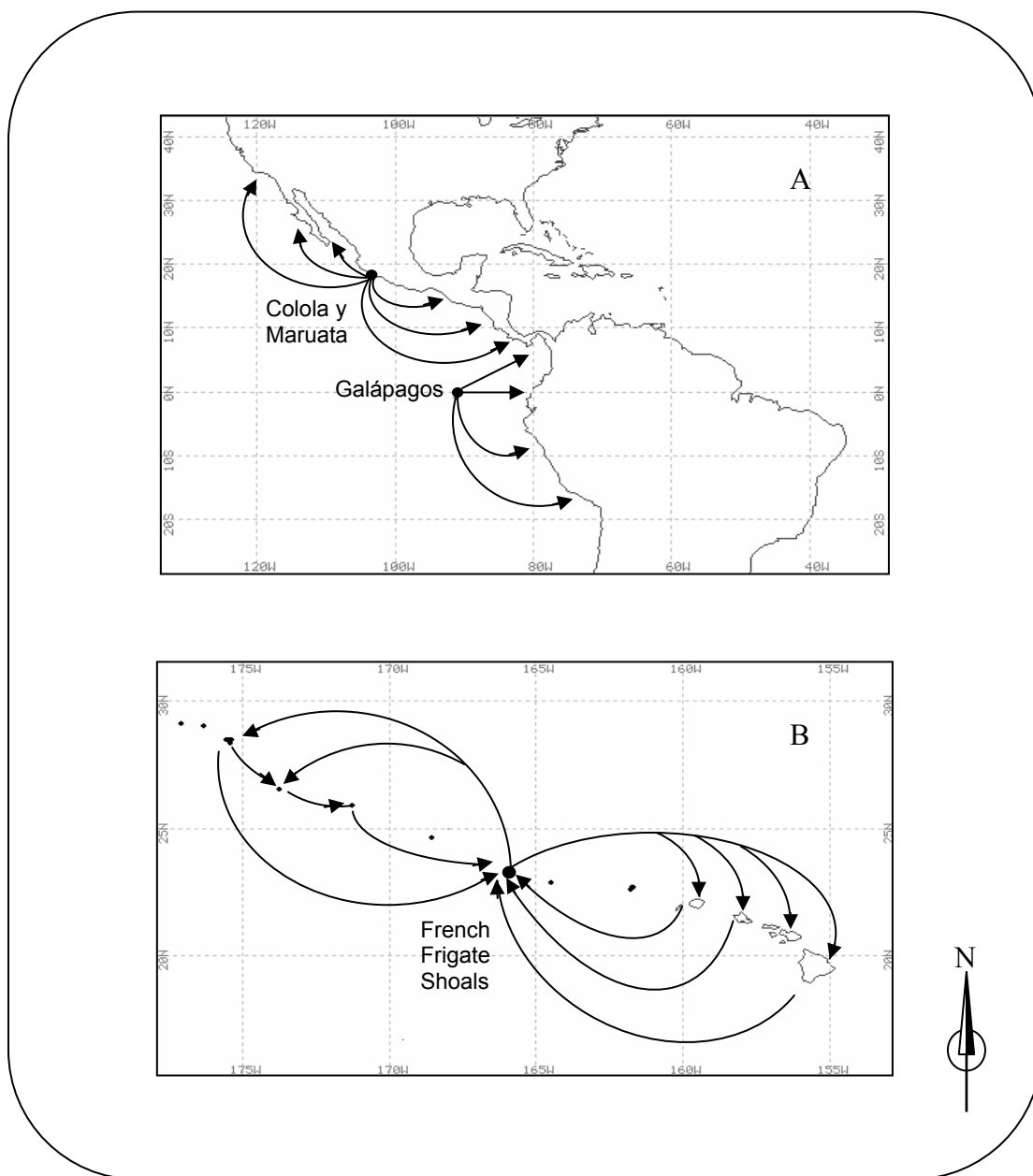


Figura 11. Área de distribución y principales sitios de anidación de las poblaciones de *Chelonia mydas* bajo estudio. A) Población del Pacífico oriental, con sus principales áreas de anidación en Colola y Maruata, Michoacán, y las Islas Galápagos. B) Población del Archipiélago Hawaiiano, con su zona de anidación más importante en French Frigate Shoals. Modificado de Balazs (1995b), Clifton *et al.*, (1995), U.S. Fish and Wildlife Service, (1997) y la página web de Signell R. en la NOAA/NGDC: <http://rimmer.ngdc.noaa.gov/coast/>.

6.2. Obtención de Muestras

Se colectaron muestras de tejidos (hígado, pulmón, músculo, riñón y corazón) provenientes de tortugas negras de Bahía Magdalena, Baja California, México (Fig. 9). A su vez, se obtuvieron muestras de tumores cutáneos de tortugas verdes infectadas con FP provenientes de Bahía Kailua y Bahía Kanehoe, Hawaii, E.U.A. (Fig. 10).

Debido a que los números bajos de las poblaciones de tortugas marinas no permiten el sacrificio de organismos para su estudio, la obtención de muestras de tejidos se hizo a partir de tortugas marinas capturadas por pesca incidental y con menos de 6 horas de haber muerto. Las necropsias se hicieron de acuerdo al manual de Wolke y George (1981). Las muestras de tumores fueron obtenidas de las tortugas en Hawaii mediante cirugía. Tanto los tejidos como los tumores se colocaron en crioviales de polipropileno (~1 g cada uno) y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido.

La sangre se colectó de organismos vivos capturados en Bahía Magdalena, Bahía de Los Ángeles y Punta Abreojos en Baja California, y en Bahía Kailua y Bahía Kanehoe en Hawaii. Las muestras (~5 mL) se colectaron del seno venoso cervical (Fig. 12A) utilizando tubos Vacutainer® (20 y 21 G 1¹/₂) con heparina de litio como anticoagulante (Owens y Ruíz, 1980; Owens, 2000). La sangre se mantuvo en hielo para posteriormente obtener el material intracelular de los eritrocitos, necesario para los ensayos enzimáticos. Las muestras de tejidos y sangre de las tortugas de Baja California (libres de FP) fueron almacenadas en los laboratorios del CIBNOR en un ultracongelador a -70°C hasta su análisis. Las muestras obtenidas en Hawaii (tumores y sangre de tortugas con FP) fueron enviadas al los laboratorios del Department of Biomedical Sciences, Ohio

University, Ohio E.U.A., donde fueron procesadas bajo la supervisión del Dr. Peter Johnson. No se efectuó la importación de muestras contaminadas de FP a México con el fin de evitar la dispersión de esta enfermedad a Baja California. Cuando fue posible, se tomaron algunos datos morfométricos de los organismos muestreados (apéndices I, II y III) como el largo recto del carapacho mínimo (LRC) (Fig. 12B) y el peso. Además, se determinó el estado de madurez de las tortugas, tomando como juveniles a todos aquellos organismos que midieran hasta 40 cm de LRC, como subadultos a los que su LRC estaba de 41 cm a 70-100 cm (dependiendo de la población), y como adultos a los organismos entre 70-100 cm, de acuerdo al U.S. Fish and Wildlife Service (1997). Por último, se determinó el sexo de los organismos adultos, tomando en cuenta la longitud relativa de la cola (la cola de los machos sobrepasa el borde del carapacho) (U.S. Fish and Wildlife Service, 1997; Bolten, 2000; Wibbels, 2000; Márquez, 2002). Las tortugas de Hawaii fueron examinadas externamente para detectar la presencia de fibropapilomas; su número, tamaño y localización fueron registrados. Además se les asignó el FPS (fibropapilloma severity score) en una escala de 0-4, donde FPS = 4 indica los casos más severos, FPS = 3 las altamente afectadas, FPS = 2 moderadamente afectadas, y FPS = 1 ligeramente afectadas. A las tortugas sin FP se les asignó un FPS = 0 (Balazs, 1991).

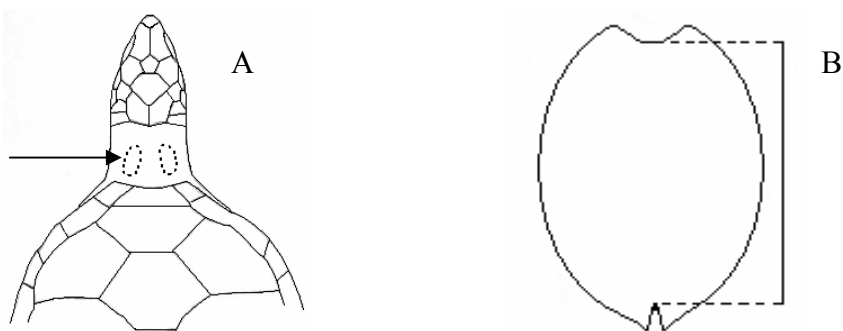


Figura 12. A) Ubicación del seno venoso cervical (Modificado de Wibbels, 2000). B) Longitud recta del carapacho mínima (LRC) (Modificado de Bolten, 2000).

6.3. Análisis de Laboratorio

Las muestras de tortugas sanas fueron procesadas en los laboratorios de Estrés Oxidativo y Bioquímica del CIBNOR. Debido al riesgo que representa importar a México las muestras de tortugas con fibropapilomas, éstas fueron procesadas en el laboratorio del Dr. Peter Johnson en la Universidad de Ohio, EUA.

6.3.1. Producción de Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Para cuantificar la producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ se empleó un método espectrofotométrico indirecto y discontinuo, que cuantifica la reducción de ferricitocromo c por el $O_2^{\cdot-}$ durante un intervalo de tiempo fijo (Markert *et al.*, 1984; Drossos *et al.*, 1995).



(Halliwell y Gutteridge, 1999).

Se colocaron 100 mg de tejido en un tubo de ensayo con 1 mL de solución amortiguadora Krebs fosfato. A cada tubo se le agregó 1 mL de citocromo c para después ser incubados por 15 minutos en un baño de agua a 37°C. Posteriormente se añadió 1 mL de N-etilmaleimida para detener la reducción de citocromo c. Se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 550 nm en un espectrofotómetro (Jenway UV/Vis 6305, Princeton, NJ.). Para cada muestra se preparó un blanco agregando al tejido 1 mL de solución amortiguadora Krebs fosfato, posteriormente la N-etilmaleimida y por último el citocromo c. Los tubos se incubaron, se centrifugaron y se leyeron nuevamente bajo las mismas condiciones.

Los resultados se expresaron en nanomoles de radical O_2^- por minuto por miligramo de tejido (nmoles/min*g).

6.3.2. Determinación de la Peróxidación de Lípidos

Para cuantificar el daño generado por las EROs, se determinó la peroxidación de lípidos en base al contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Persky *et al.*, 2000), el cual es llamado de esta manera debido a que no proporciona un valor absoluto, sino el valor relativo de los hidroperóxidos y de los aldehídos lipídicos resultantes. Dichas sustancias reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar el mismo producto terminal que es el malondialdehído (MDA), el cual se manifiesta como un pigmento rosa cristalino con una absorción máxima a 532-535 nm (Bird y Draper, 1984).

Se realizó una curva estándar con TEP en un rango de 0 a 5 nmoles/250 μ L. Se homogenizaron 100 mg de tejido en 2 mL de solución salina (0.9 %) fría. Se tomaron 250 μ L de homogenizado de tejido y de las soluciones de la curva estándar, y se les realizó el mismo procedimiento de cuantificación. Se incubaron durante 15 minutos en un baño de agua a 37°C, después de lo cual se detuvo la reacción añadiendo ácido tricloroacético (TCA 12.5 %) para detener la reacción. Se añadió TBA al 1 % y se incubaron a 100°C durante 10 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se leyó el sobrenadante a 532 nm en un espectro UV/ VIS (Jenway 6305, Princeton, NJ.). Los resultados, calculados a partir de la curva estándar, se expresaron en nanomoles de sustancias reactivas al TBA por gramo de tejido (nmoles/g).

6.3.3. Cinéticas Enzimáticas

La actividad de una enzima se define como la velocidad a la cual una enzima está transformando su sustrato en producto. Para cuantificar el grado de actividad de una enzima es posible medir la desaparición del propio sustrato, o bien, la aparición del producto (Stryer, 1995).

En este estudio se evaluó la actividad de tres enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Estas enzimas se evaluaron en tejidos y material intracelular de eritrocitos de tortugas marinas.

Muestras de Tejidos

Los tejidos fueron homogenizados en 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5). Se centrifugaron a 3 500 rpm durante 10 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante para realizar los ensayos.

Muestras de sangre

Después de haber obtenido las muestras de sangre, y todavía en campo, se procedió a lavar las células rojas para obtener su contenido intracelular de acuerdo al método de Pippenger *et al* (1998): la sangre completa se centrifugó a 1000 g, 10 min, se separó el plasma y se congeló en nitrógeno líquido. Se eliminó la capa de leucocitos. A los eritrocitos se les agregó el doble de su volumen de solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). Se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y la capa restante de leucocitos. Los eritrocitos se lavaron dos veces más con solución salina.

Posteriormente, los eritrocitos fueron lisados por choque osmótico y mecánico al añadirles agua destilada y agitarlos bruscamente. Finalmente, se congeló el material intracelular por inmersión en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

6.3.3.1. Superóxido Dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1)

Esta enzima utiliza como substrato al O_2^- , el cual es altamente inestable, por lo que la cuantificación de la actividad catalítica de la SOD es indirecta. El método más frecuentemente empleado utiliza el sistema de la xantina/xantina oxidasa como generador constante de O_2^- y la reducción del nitroazul tetrazolio (NBT), como detector del mismo (Suzuki, 2000), ya que da como resultado un producto azul llamado formazan, el cual es fácilmente detectable. No obstante, la reacción del O_2^- con el NBT es muy compleja (Halliwell y Gutteridge, 1999). El principio de esta técnica se basa en la inhibición de la reducción del NBT por la SOD (Suzuki 2000). El citocromo c, es otro detector ampliamente utilizado (McCord y Fridovich, 1969).

Durante el ensayo, todos los reactivos se mantuvieron a 25°C. Tanto las muestras de tejidos, como las de sangre, se diluyeron 1:20 con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M). En una celda de plástico se colocaron y mezclaron: solución amortiguadora sodio-carbonato (50 mM), conteniendo 0.1 mM xantina, 0.025 mM NBT y 0.1 mM EDTA, y 25 μ L de muestra o solución de homogenización en el caso del blanco. Inmediatamente se registró el cambio de absorbancia cada 30 seg, a 560 nm, durante 5 min (ΔA_{560}). La actividad fue expresada en U/mg proteína en el caso de los tejidos, mientras que para la sangre se utilizaron U/g Hb.

Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe la reacción del $O_2^{\cdot -}$ con el NBT en un 50% (Suzuki, 2000).

6.3.3.2. Catalasa (CAT) (E.C.1.11.1.6)

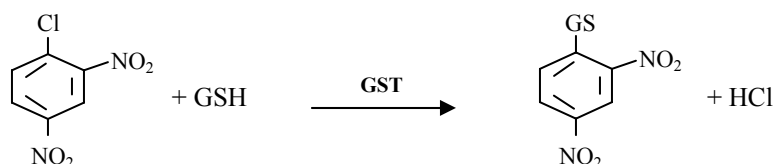
Esencialmente, esta técnica mide la desaparición del H_2O_2 a 240 nm. La descomposición enzimática del H_2O_2 es una reacción de primer orden; su tasa es proporcional a la concentración de peróxido presente, por lo que se trabaja con concentraciones bajas del mismo. (Aebi, 1984).

Las muestras de sangre se diluyeron 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M), pH 7.0. Las muestras de tejido se utilizaron directamente del sobrenadante obtenido. Todos los reactivos se mantuvieron a 25°C. Se ajustó la concentración de H_2O_2 a 10 ± 0.5 mM/L con solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.0). El cálculo se realizó con la fórmula: $[H_2O_2] = 21.81 \times A_{240} - 0.36 = \text{mM/L}$. Se colocó esta solución ajustada en una cubeta de cuarzo, se agregaron 10 μL de muestra y se mezclaron. El cambio de absorbancia a $\lambda = 240$ nm se registró cada 15 segundos durante 3.5 min (ΔA_{240}). Para los tejidos la actividad fue expresada en U/mg proteína, mientras que para la sangre en U/g Hb.

Una unidad de actividad de catalasa es definida como la cantidad de enzima que induce un cambio en A_{240} de 0.0394 durante 3 minutos de incubación.

6.3.3.3. Glutathión S Transferasa (GST) (E.C. 2.5.1.18)

Todas las transferasas son activas con el 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), por lo que en esta técnica se evalúa la aparición del complejo tioéter glutati6n-dinitrobenzeno a 340 nm, lo cual depende directamente de un cambio en la absorbancia cuando el CDNB se conjuga con el GSH:



(Habig y Jakoby, 1981).

Las muestras de sangre se diluyeron 1:10 con soluci6n amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.0). Las muestras de tejido se utilizaron directamente del sobrenadante obtenido. A una celda de cuarzo se agreg6 soluci6n amortiguadora de fosfatos (50mM), conteniendo glutati6n reducido (GSH, 1 mM) y 0.5 mM EDTA , 10 mM CDNB y 10 μL de muestra. Se registr6 el cambio de absorbancia cada 30 seg durante 6 min a $\lambda = 340 \text{ nm}$ (ΔA_{340}). El blanco se prepar6 substituyendo la muestra por soluci6n amortiguadora de homogenizaci6n. La actividad fue expresada en U/mg prote6na en el caso de los tejidos, sin embargo, en la sangre se expres6 como U/g Hb.

Una unidad de actividad de GST es definida como la cantidad de enzima que cataliza a conjugaci6n de 1 μmol de CDNB/min a 25°C.

6.3.3.4. Determinación de Proteínas

Para determinar la cantidad de proteínas solubles se utilizó el kit de Bio-Rad Laboratories (California, E.U.A.) adaptado a microplaca. Este ensayo se basa en el método descrito por Bradford (1976), el cual consiste en el cambio de color del colorante azul de Coomassie®, en respuesta a la concentración de proteínas. Este colorante reacciona con los residuos de aminoácidos básicos, especialmente la arginina.

Las muestras de tejidos se diluyeron 1:100 con la misma solución en que fueron homogenizadas para la determinación de la actividad enzimática. Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina en un rango de concentraciones de 10 a 200 mg/mL. En una microplaca, se agregaron a cada pozo: 155 μL de dH_2O , 45 μL de colorante azul de Coomassie® y 25 μL de cada estándar de albúmina o bien, 25 μL de muestra. Se preparó un blanco adicionando dH_2O y colorante. Tanto las muestras, como el blanco y la curva estándar se corrieron por triplicado. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 min, después de los cuales se leyó la absorbancia a $\lambda = 620 \text{ nm}$ en un lector de microplaca (MULTISCAN LABSYSTEMS Modelo: 352). Los datos se expresan en mg/mL de proteína. Los cálculos de la concentración de proteínas en cada muestra se hicieron en base a la regresión obtenida de la curva estándar.

6.3.3.5. Determinación de Hemoglobina

En presencia de ferricianuro de potasio alcalino, la hemoglobina (Hb) es oxidada en methemoglobina, la cual reacciona con el cianuro de potasio para formar cianmethemoglobina, la cual absorbe a 540 nm. La intensidad de la absorbancia es directamente relacionada con la concentración de hemoglobina en la muestra (Manual de

usuarios del kit HG 980 para hemoglobina total RANDOX). El análisis del contenido de Hb en muestras de sangre se realizó mediante el uso del kit 525 de SIGMA (St. Louis, MO., E.U.A.), y el kit HG980 de RANDOX (San Diego, CA., E.U.A.).

A tubos de ensayo con 5.0 mL de solución Drabkin contenida en el kit (52 mM fosfato de potasio, 30.4 mM ferricianuro de potasio, 38.4 mM cianuro de potasio, 25 % solución Brij-35); se agregaron 20 μ L de estándares de Hb (60-180 mg/mL) para realizar una curva estándar, o bien, 25 μ L de contenido intracelular de eritrocitos. Se utilizó como blanco el reactivo de Drabkin. Los datos se obtuvieron a partir de la curva estándar y se expresaron en mg/mL de Hb.

6.4. Análisis Estadísticos

Los datos se separaron en dos grupos y se analizaron de manera independiente; por una parte, los tejidos (incluyendo el tejido tumoral), y por otra, la sangre. Se aplicaron las pruebas básicas de estadística descriptiva, en las que se obtuvieron la media, desviación estándar y error estándar de los datos. A los resultados obtenidos se les aplicaron las pruebas de bondad de ajuste, incluyendo la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff (K-S), el análisis de homogeneidad de varianzas de Barlett, y la prueba de correlación (entre medias y error estándar). Al no cumplir los datos con todos los supuestos, y sumando a ello el bajo número de muestras obtenidas, se optó por recurrir a la estadística no paramétrica para realizar comparaciones (Zar, 1999).

Tanto en la sangre, tejidos y tumores de tortugas marinas, se hicieron comparaciones de variables que pudieran estar afectando los resultados, como es el caso de

factores bióticos (edad, sexos, FPS), y factores abióticos (localidades de colecta dentro de Baja California y dentro de Hawaii, estación del año en que se obtuvieron las muestras). Para la realización de estas comparaciones se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) por rangos de Kruskal-Wallis para detectar si había diferencias entre ellos. Posteriormente se hicieron pruebas U de Mann-Whitney para detectar las diferencias puntuales (Zar, 1999). Se aplicó un análisis de regresión entre las variables evaluadas y la LRC (indicador de edad) de los organismos y la FPS de las tortugas enfermas para buscar posible correlaciones (Zar, 1999).

Por otra parte, utilizando las mismas pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney), se hicieron comparaciones entre los tejidos (incluyendo el tejido tumoral) para apreciar las diferencias entre ellos (Zar, 1999). A su vez, se realizó un análisis de funciones discriminantes con el fin de encontrar cuáles de las variables evaluadas son los mejores indicadores de cambios o diferencias en el metabolismo oxidativo en los tejidos (Zar, 1999). En cuanto a la sangre, utilizando un ANOVA por rangos de Kruskal-Wallis, se hizo una comparación de las muestras de tortugas de Baja California (aparentemente sanas), y las muestras de tortugas de Hawaii (con tumores) (Zar, 1999).

El grado de significancia que se consideró en este estudio fue de $p \leq 0.05$ (Zar, 1999). Para llevar a cabo los análisis, se hizo uso de los programas computacionales Excel, Statistica y Systat.

7. RESULTADOS

7.1. Comparaciones Dentro de los Grupos

7.1.1. Factores Bióticos

7.1.1.1. Grupos de Edad

Este análisis se realizó en las muestras de tejidos y sangre de tortugas negras de Baja California. Las tortugas verdes de Hawaii sanos y con FP no pudieron analizarse por edades debido a que todos pertenecían a un mismo cohorte. Las tortugas negras presentaron dos grupos de edad de acuerdo al U.S. Fish and Wildlife Service (1997): subadultos y adultos. En los apéndices I y II se muestran los datos biométricos de las tortugas estudiadas.

Los resultados de las comparaciones pueden apreciarse en las figuras 13-16. Los organismos subadultos presentaron una tendencia no significativa a producir mayores cantidades de O_2^- en el pulmón ($p=0.07$) y en el riñón ($p=0.06$) (Fig. 13). Por otra parte, los adultos resultaron tener incrementados los niveles de TBARS en un 56.6% con respecto al tejido renal de los subadultos ($p=0.04$) (Fig. 14). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes en general, se aprecia la tendencia no significativa de los adultos a tener una mayor actividad de la SOD en el hígado ($p=0.06$) (Fig. 15A), y a tener una mayor actividad de la CAT ($p=0.08$) en la sangre (Fig. 16B).

Como complemento a los resultados obtenidos, se hizo un análisis de regresión entre las variables evaluadas y la edad de los organismos, tomando como indicador de edad la LRC de las tortugas. Sin embargo no se encontró ninguna correlación, como lo indican los bajos coeficientes de correlación (R^2) que se aprecian en la Tabla I.

Tabla I. Coeficientes de correlación (R^2) obtenidos de las regresiones lineales entre los diferentes parámetros del metabolismo oxidativo de tejidos y sangre de tortugas negras y la LRC de las mismas como indicador de edad. Se trata de tortugas negras colectados en las costas de Baja California, México.

Indicadores	R^2					
	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	Sangre
O_2^-	0.01	0.1	0.2	0.1	0.2	-
TBARS	0.04	0.001	0.02	0.01	0.01	-
SOD	0.1	0.1	0.002	0.3	0.5	0.03
CAT	0.1	0.1	0.04	0.1	0.01	0.01
GST	0.02	0.02	0.02	0.01	0.1	0.1

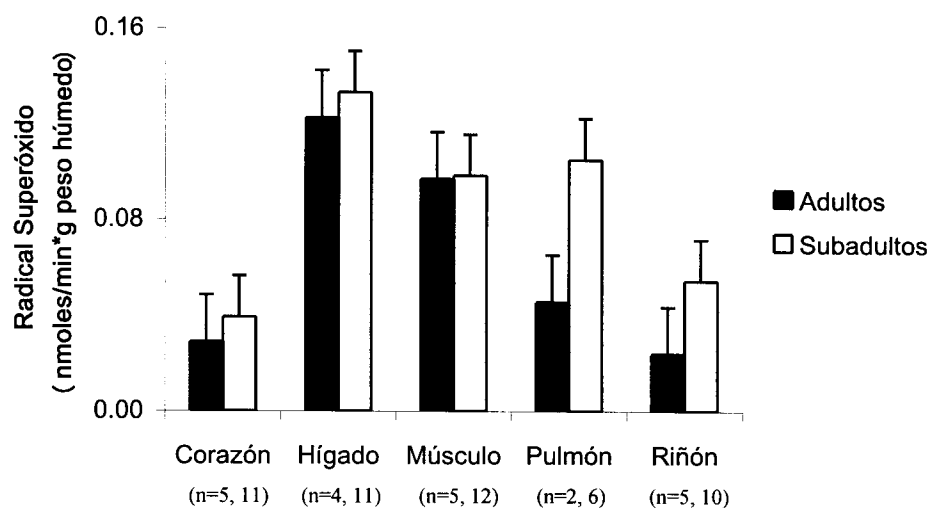


Figura 13. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en tejidos de tortugas negras pertenecientes a diferentes grupos de edad. Los valores se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

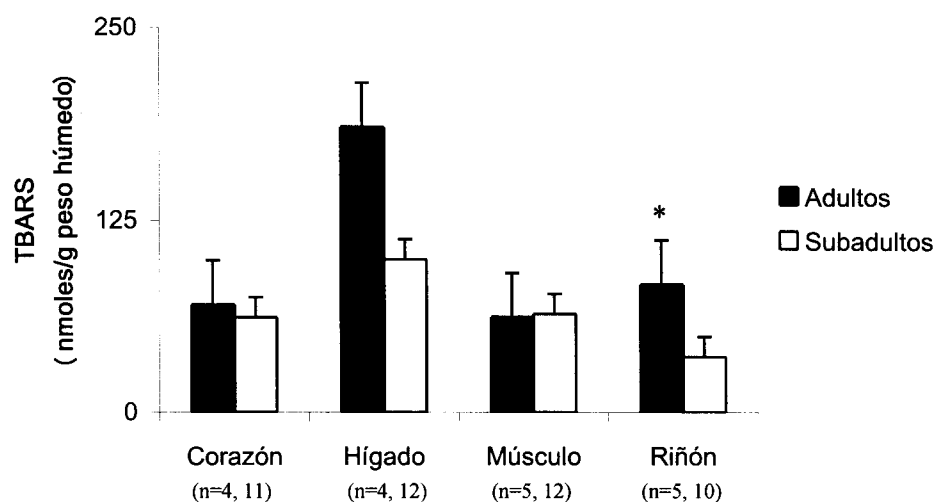


Figura 14. Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) en diferentes tejidos de adultos y subadultos de tortugas negras. Los valores graficados se indican como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$), n = número de muestras.

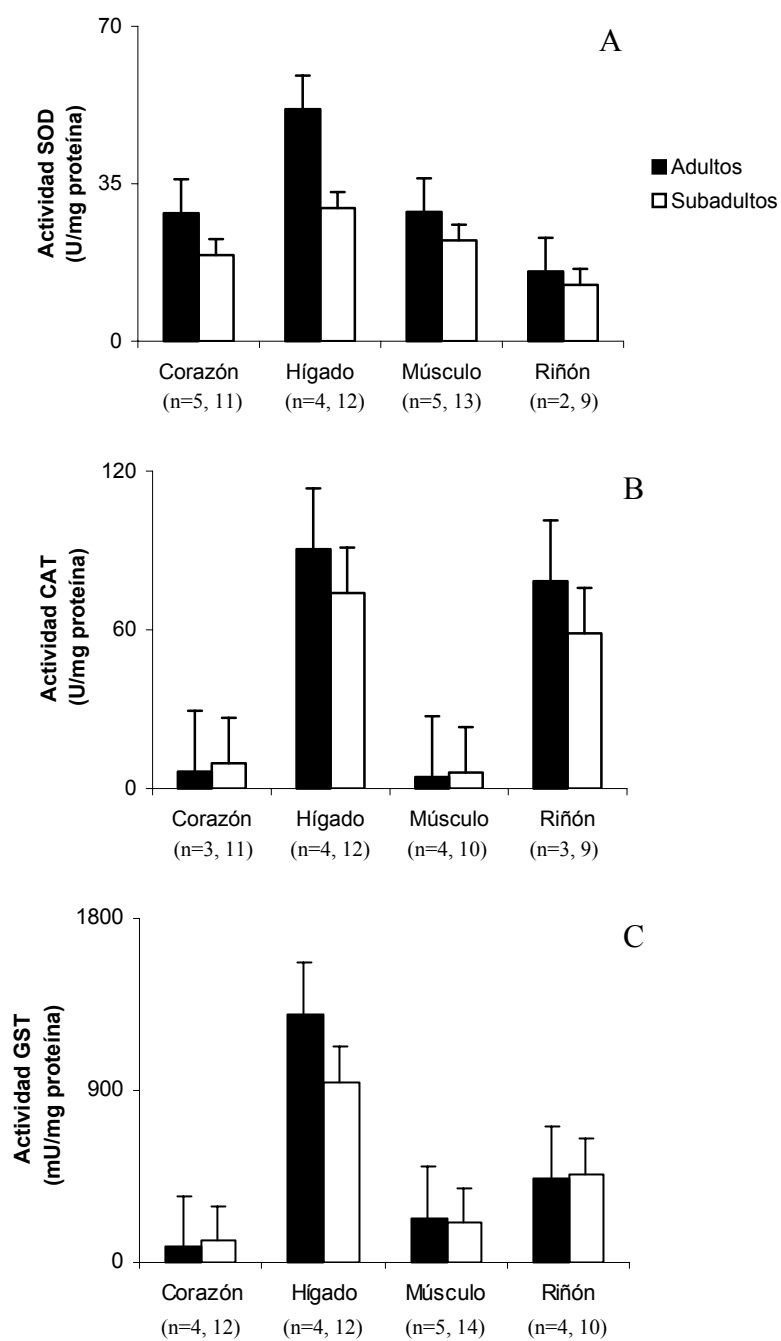


Figura 15. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en los tejidos de tortugas negras dependiendo de su edad. Los valores graficados se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

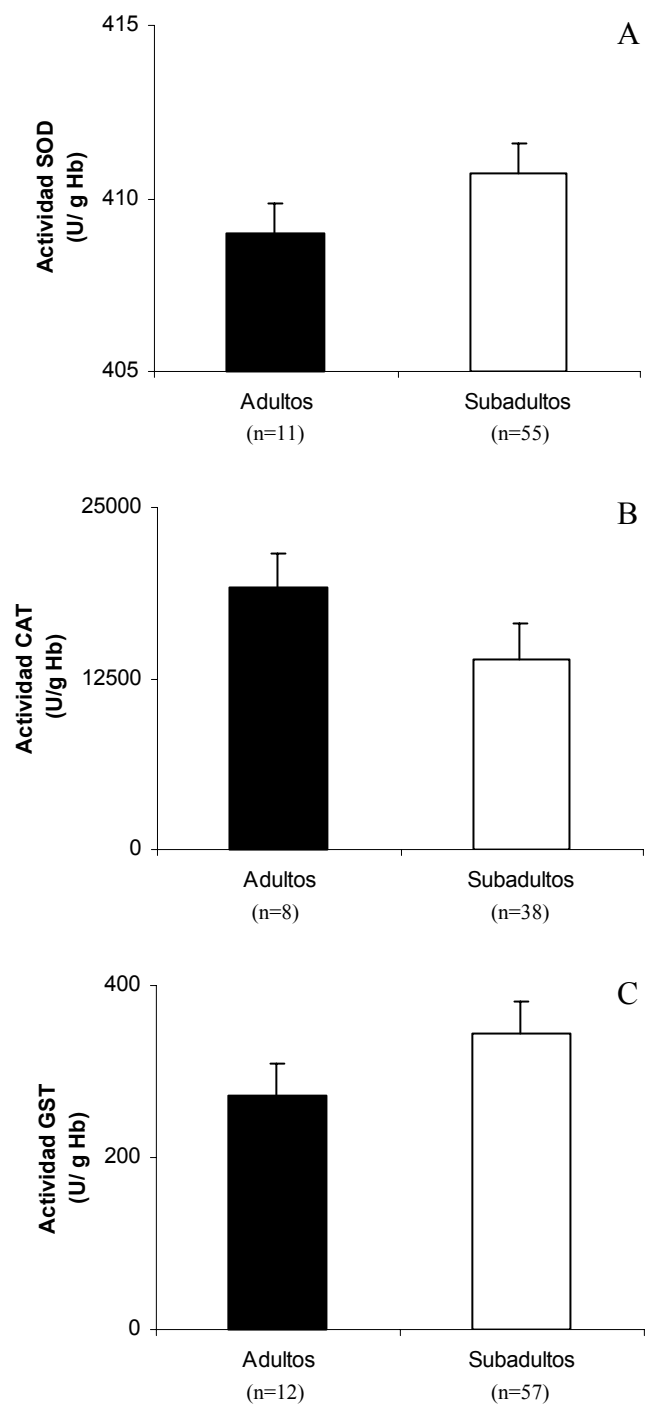


Figura 16. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos, por grupo de edad, en tortugas negras. Los valores graficados se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

7.1.1.2. Sexo

Indagando la posibilidad de que el metabolismo oxidativo fuera diferente en las tortugas negras hembra y macho, se analizaron los organismos adultos libres de FP capturados en Baja California, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre. Cabe mencionar que no se hicieron análisis por sexos en las muestras de tejidos de las tortugas de esta localidad, debido a que todos ellos resultaron ser hembras. Tampoco se analizaron las tortugas provenientes de Hawaii debido a que todas fueron determinadas como subadultos, y por lo tanto, todavía no desarrollaban lo suficiente sus caracteres sexuales secundarios que permitieran sexarlas. Los datos generales de las tortugas sometidas a este análisis se pueden ver en el apéndice II.

No se encontraron diferencias significativas por sexos de la actividad de la enzima SOD en la sangre de los organismos analizados (Fig. 17A). No se hicieron comparaciones estadísticas entre sexos de la enzima CAT, ya que solamente se tienen resultados para una tortuga macho, sin embargo, los valores encontrados se aprecian en la Fig. 17B. Se observó la tendencia no significativa de que los machos presenten actividades mayores de GST ($p=0.06$) (Fig. 17C).

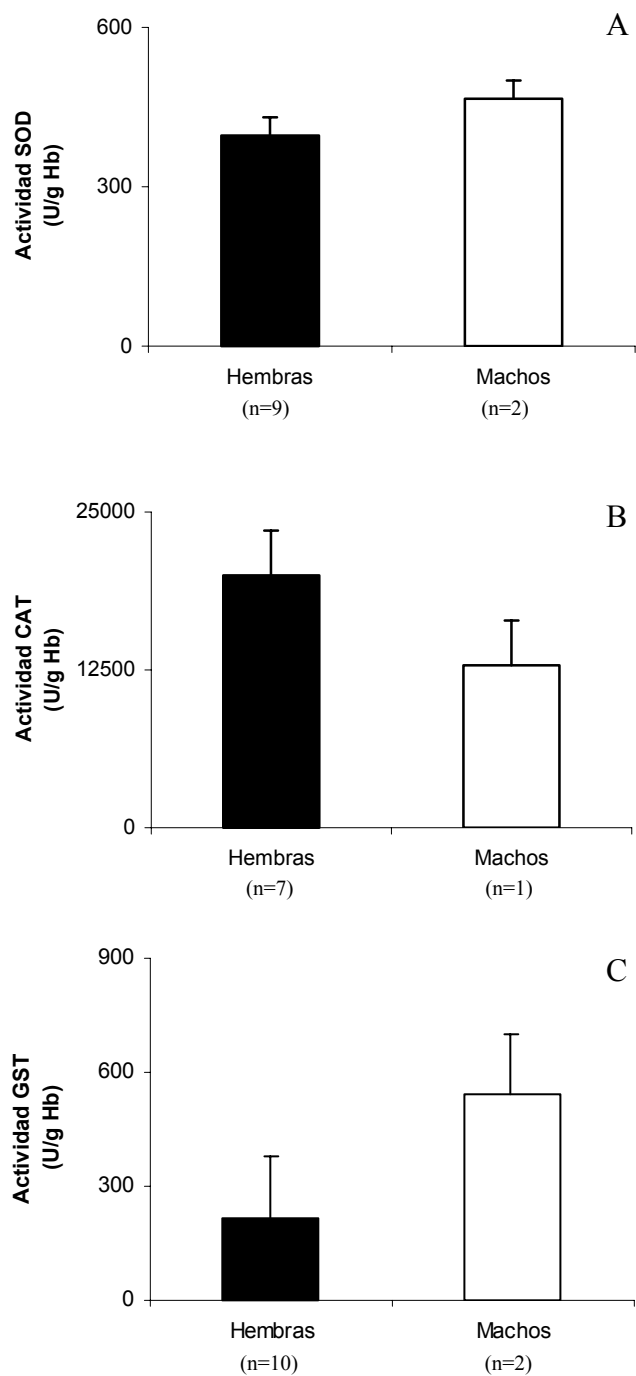


Figura 17. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT), C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas negras segregadas por sexos. Los valores graficados se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

7.1.1.3. Grado de Severidad de la Fibropapilomatosis (FPS)

Se hicieron comparaciones entre las muestras de tumores y de sangre obtenidas de tortugas verdes con un diferente grado de avance de FP o FPS.

Los resultados se observan en las figuras 18-21. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, se observaron algunas tendencias no significativas en los datos; los niveles de peroxidación de lípidos tienden a ser mayores cuando el FPS=2 ($p=0.07$) (Fig. 19). La actividad de la enzima SOD en los tumores disminuye conforme el FPS incrementa, sin embargo, dicha tendencia no es significativa ($p=0.14$) (Fig. 20A). En la Fig. 21B se aprecia la actividad de la CAT, en donde la parte concerniente al FPS=1 no se analizó estadísticamente debido a que solamente se obtuvo una muestra.

Al igual que con los grupos de edades, se hizo un análisis de regresión entre las variables evaluadas y el FPS, sin embargo, no se encontró ninguna correlación, como lo muestran las R^2 en la Tabla II.

Tabla II. Coeficientes de correlación (R^2) obtenidos de las regresiones lineales entre los diferentes parámetros del metabolismo oxidativo de tejidos y sangre de tortugas verdes con FP y el grado de severidad de esta enfermedad (FPS). Las muestras fueron obtenidas de las Islas de Hawaii, E.U.A.

Indicadores	R^2	
	Tumores	Sangre
O_2^-	0.002	-
TBARS	0.1	-
SOD	0.5	0.2
CAT	0.3	0.2
GST	0.3	0.1

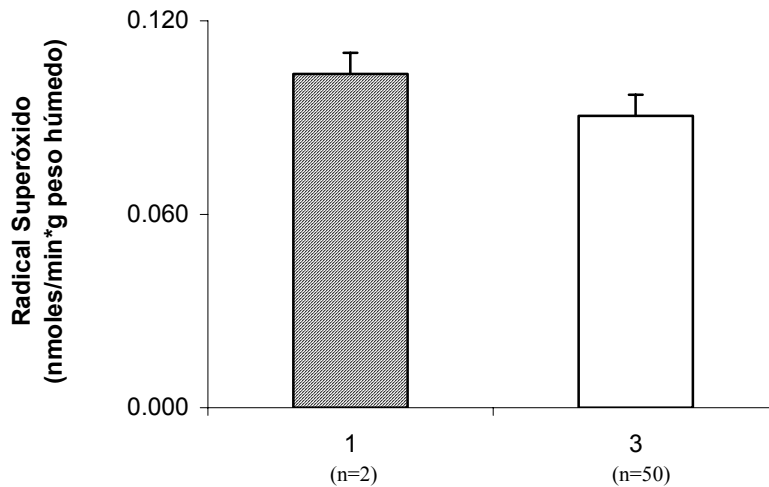


Figura 18. La producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en el tejido tumoral de tortugas verdes con diferente FPS. Los valores se expresan como media \pm error estándar. 1 = daño ligero, 3 = daño elevado. n = número de muestras.

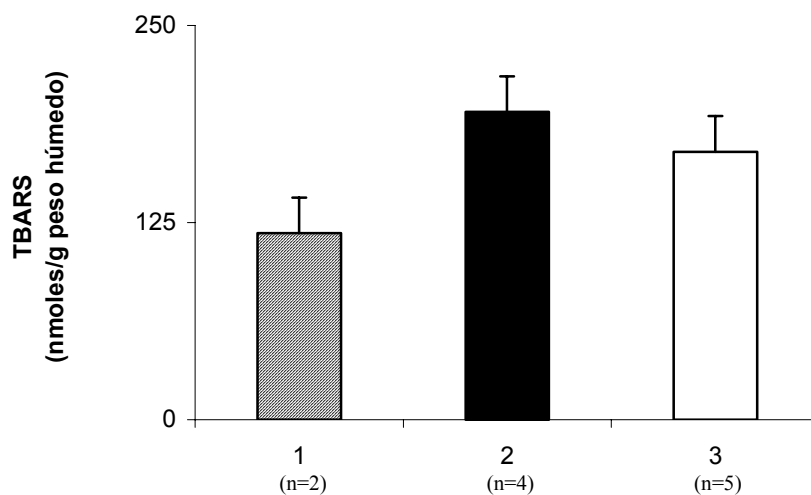


Figura 19. Peroxidación de lípidos (TBARS) de fibropapilomas de tortugas verdes con un diferente FPS. Los valores graficados se indican como media \pm error estándar. 1 = daño ligero, 2 = daño moderado, 3 = daño elevado. n = número de muestras.

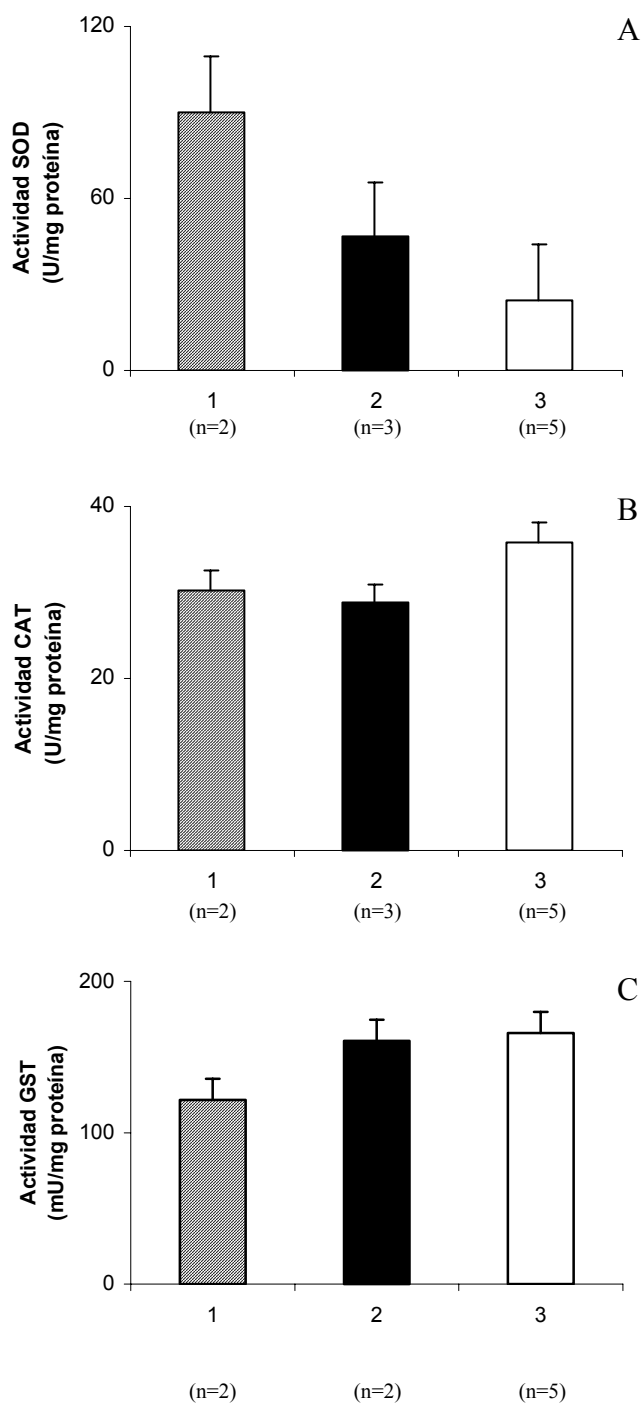


Figura 20. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en tumores de tortugas verdes dependiendo del grado de FPS. Los valores de actividad se expresan como media \pm error estándar. 1 = daño ligero, 2 = daño moderado, 3 = daño elevado. n = número de muestras.

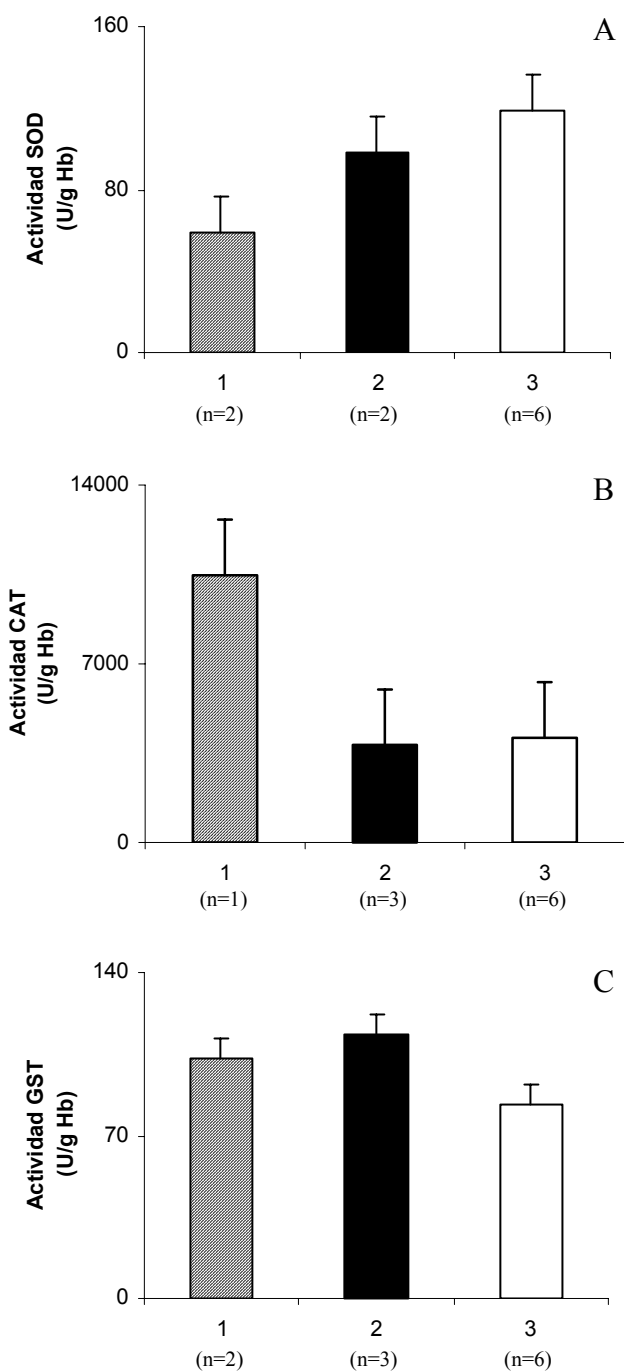


Figura 21. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes con diferente FPS. Los valores de actividad se expresan como media \pm error estándar. 1 = daño ligero, 2 = daño moderado, 3 = daño elevado. n = número de muestras.

7.1.2. Factores Abióticos

7.1.2.1 Estación del Año

Las muestras de organismos de Baja California (libres de tumores) fueron tomadas durante todo un año, por lo que se hicieron comparaciones entre los organismos muestreados en las diferentes estaciones. En los apéndices I y II se aprecian las fechas de colecta de las muestras de tejidos y sangre de tortugas negras. Las tortugas de Hawaii no se incluyeron en este análisis debido a que todas fueron colectadas en el mismo mes (octubre). En el caso de los tejidos, no se obtuvieron muestras en el otoño, y en el caso de la sangre, no se obtuvieron en el invierno, es por ello que no aparecen representados en las gráficas.

Las figuras 22-25 nos muestran los resultados obtenidos. Por una parte se presenta una menor peroxidación de lípidos en verano en tejidos como corazón y riñón, aunque la tendencia no es significativa ($p=0.06$ y $p=0.08$ respectivamente) (Fig. 23). Por otra parte se encontró que la actividad de la enzima SOD se muestra estadísticamente disminuida en el tejido muscular en verano con respecto a la primavera en un 56.2% ($p=0.01$) y con respecto al invierno en un 52.8% ($p=0.009$) (Fig. 24A). A su vez, la actividad de la enzima CAT resultó estar un 63.5% más elevada en la estación de invierno con respecto al verano en el hígado de las tortugas verdes ($p=0.04$) (Fig. 24B). La enzima GST en el músculo, mostró 40.5% menos actividad en verano con respecto a la primavera ($p=0.003$) y 47.9% con respecto al invierno ($p=0.03$) (Fig. 24C). En cuanto a la sangre, se encontró que la actividad de la GST en otoño se encuentra incrementada con un 54.6% con respecto a la primavera ($p<0.0001$) y en un 40.8% con respecto al verano ($p=0.006$) (Fig. 25C).

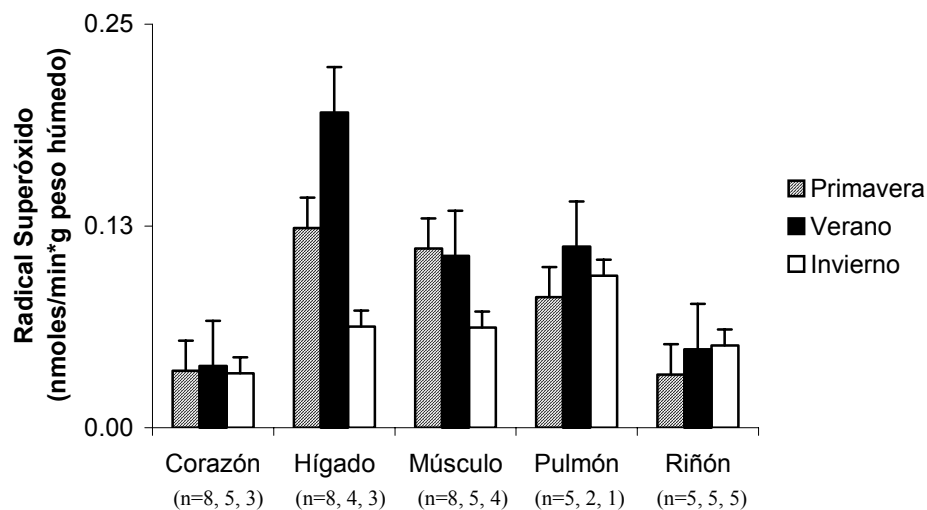


Figura 22. La producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en tejidos de tortugas negras colectadas en diferentes estaciones del año en Baja California, México. Los valores se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

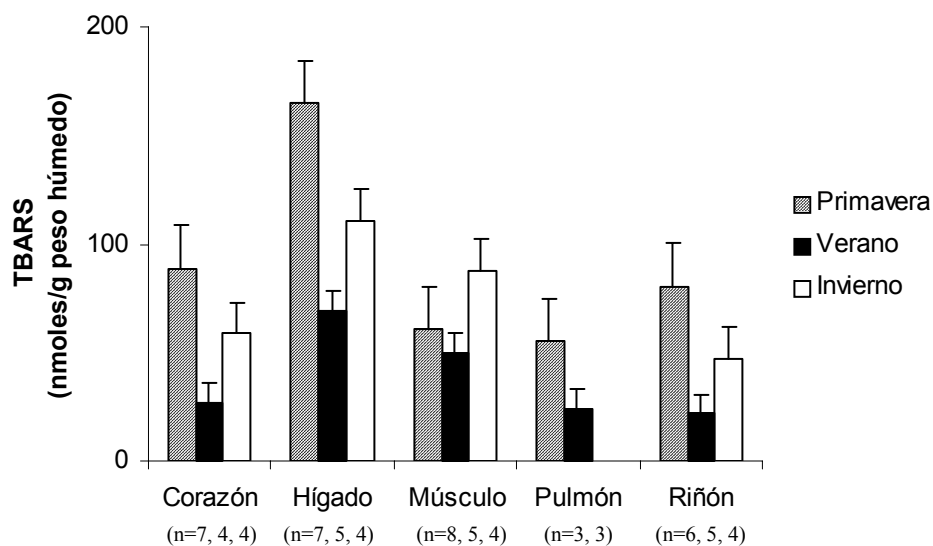


Figura 23. Peroxidación de lípidos (TBARS) en diferentes tejidos tortuga negras obtenidos en las cuatro estaciones del año en Baja California. Los valores graficados se indican como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$). n = número de muestras.

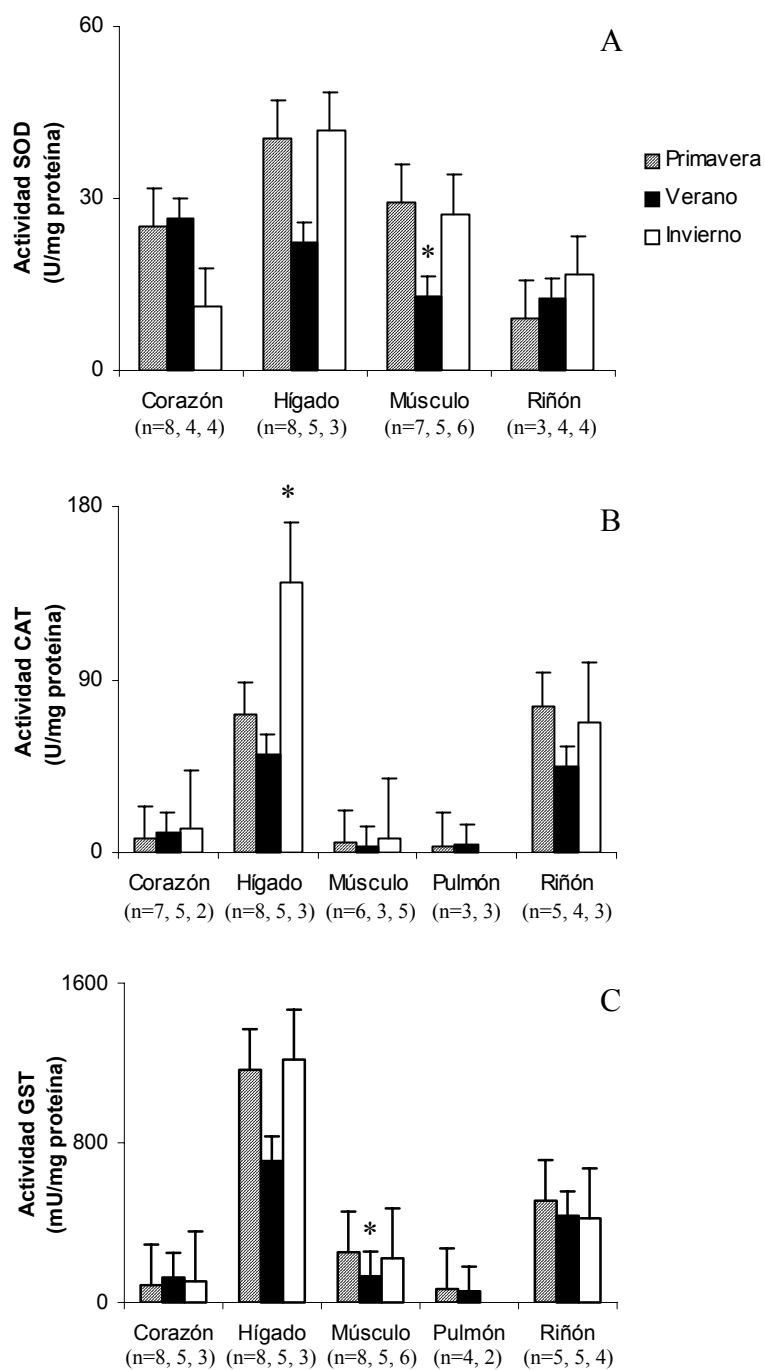


Figura 24. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en los tejidos de tortugas negras dependiendo de la estación del año en Baja California. Los valores de actividad se muestran como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$). n = número de muestras.

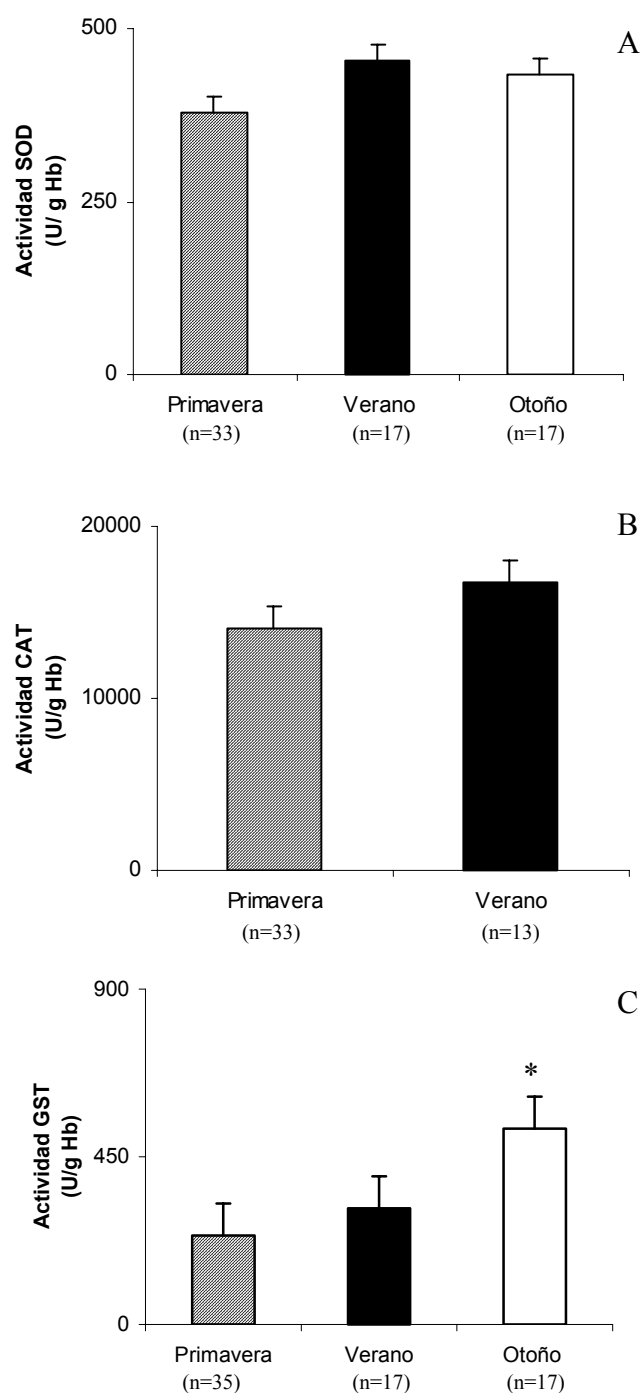


Figura 25. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes en las distintas estaciones del año en Baja California. Los valores de actividad se muestran como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$). n = número de muestras.

7.1.2.2. Localidad

Al haberse trabajado en dos diferentes localidades de Hawaii (Bahía Kaneohe y Bahía Kailua) y tres de Baja California (Bahía Magdalena, Bahía de Los Ángeles y Punta Abreojos), se hicieron comparaciones entre las muestras de sangre obtenidas de todas las localidades, así como entre las muestras de tejido tumoral de los puntos de muestreo de Hawaii. Lo anterior con el fin de apreciar la posible existencia de diferencias geográficas. Las muestras de tejidos obtenidas en Baja California no se incluyeron en este análisis, ya que todas ellas fueron colectadas en Bahía Magdalena.

Los resultados se pueden observar en las figuras 26-31. La única diferencia que se encontró fue en la actividad de la enzima CAT en el tejido tumoral, ya que resultó ser un 48.5% más elevada en las muestras de tortugas colectadas Bahía Kanehoe con respecto a las colectadas en Bahía Kailua ($p=0.04$) (Fig. 28B). Tanto en las muestras de material intracelular de eritrocitos de los puntos de muestreo de Hawaii, como en las de Baja California, no se encontraron diferencias significativas (Figs. 29-31). La actividad de la CAT de tortugas sin FP de Kaneohe no se comparó estadísticamente con las tortugas sin FP de Kailua debido a que solo se obtuvo una muestra (Fig. 29B). La actividad de la enzima (GST) en la sangre de tortugas de Baja California, tiende a ser menor en Bahía Magdalena ($p=0.07$) con respecto a las otras dos localidades (Fig. 31C).

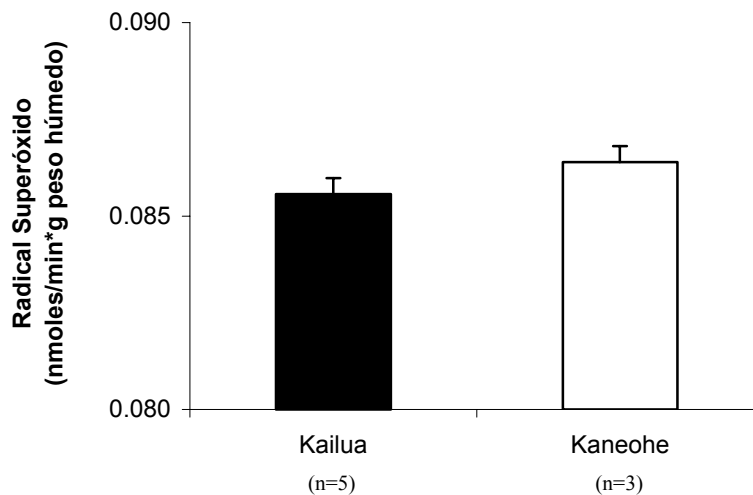


Figura 26. La producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en el tejido tumoral de tortugas verdes colectadas en diferentes localidades de Hawaii, EUA. Los valores se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

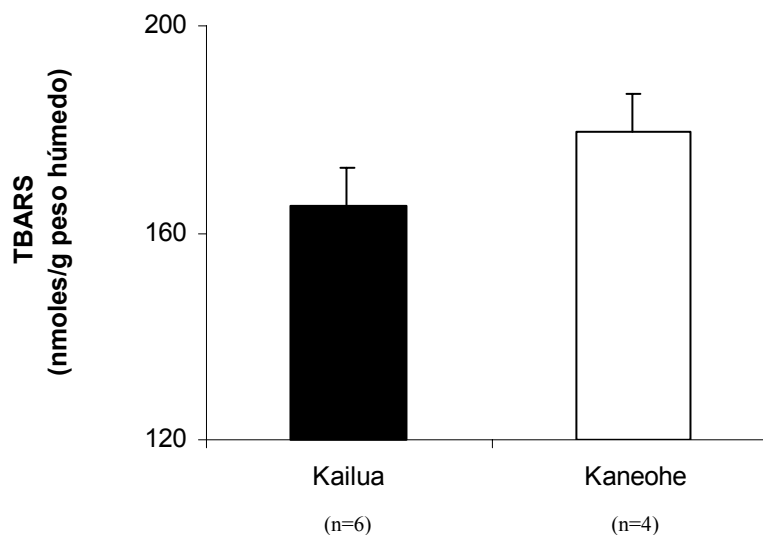


Figura 27. Peroxidación de lípidos (TBARS) de fibropapilomas de tortugas verdes obtenidos en dos localidades de las Islas de Hawaii. Los valores graficados se indican como media \pm error estándar. n = número de muestras.

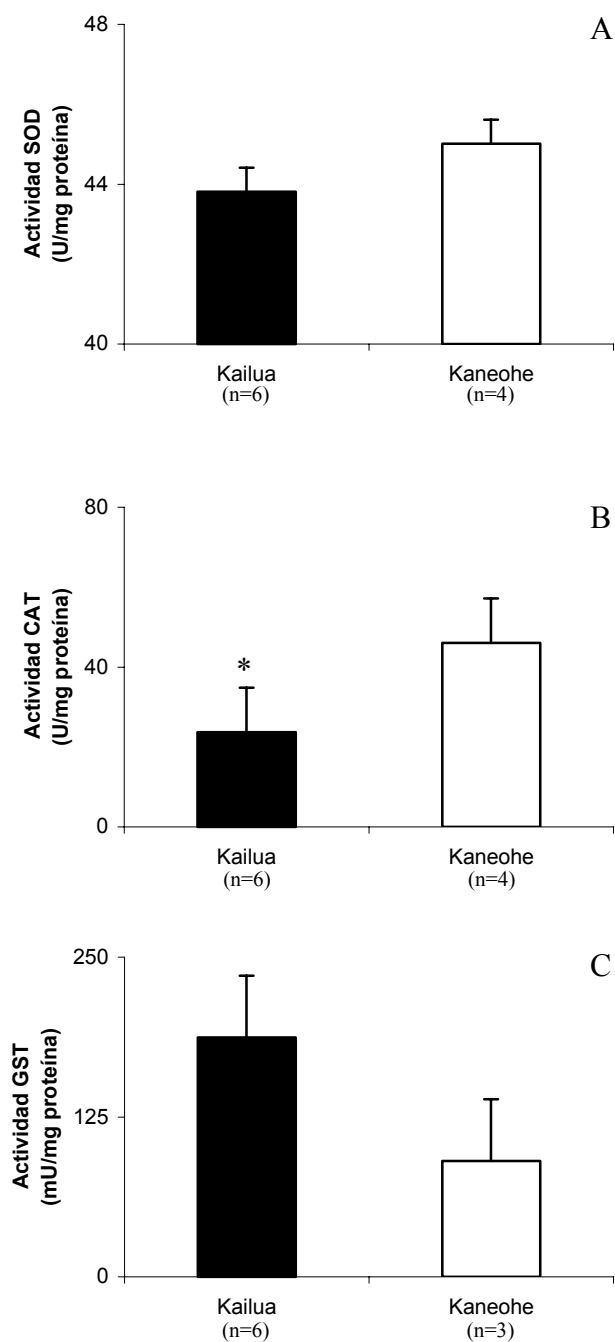


Figura 28. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en tumores de tortugas verdes dependiendo de la localidad de colecta en las Islas de Hawaiki. Los valores de actividad se expresan como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$). n = número de muestras.

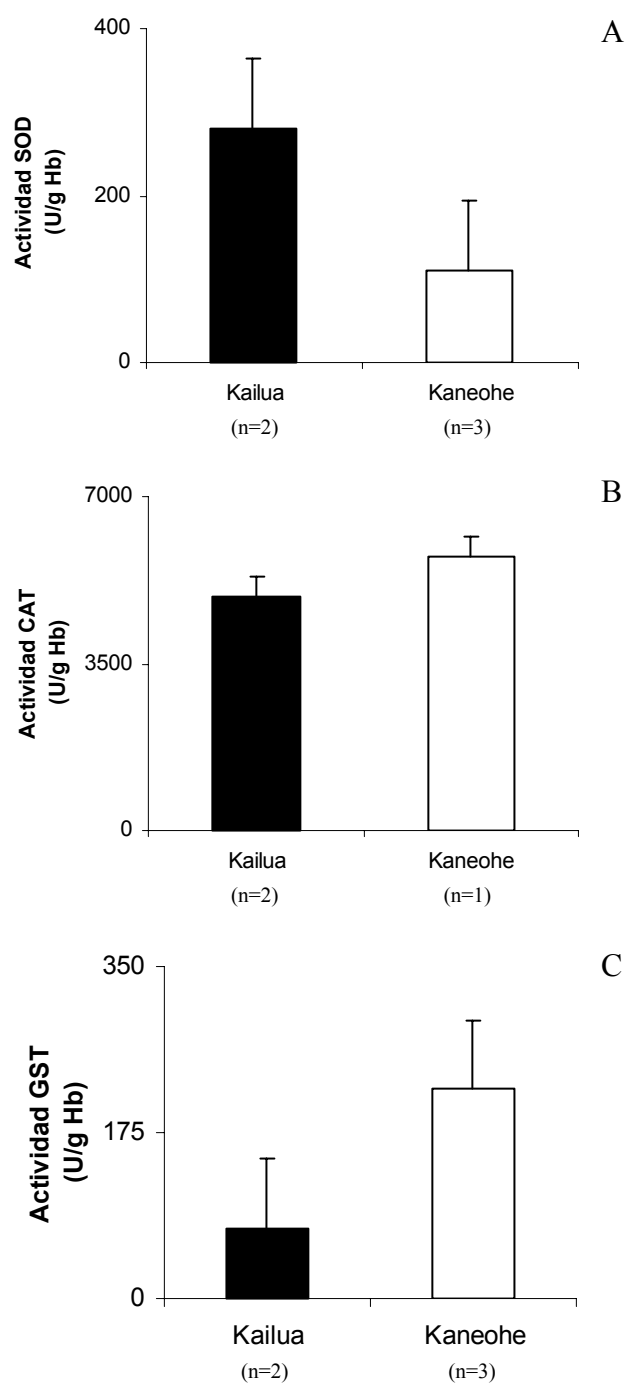


Figura 29. Actividad específica de la enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT), C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes sin FP colectadas en dos localidades de Hawaii. Los valores de actividad se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

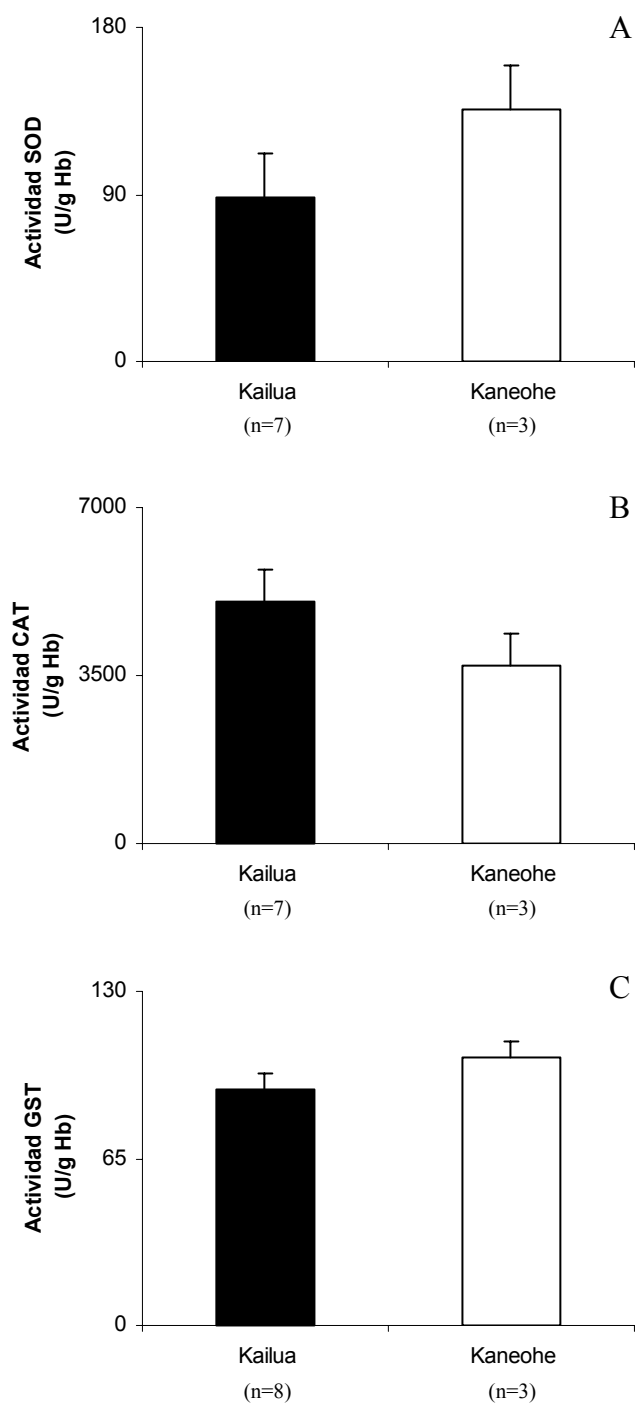


Figura 30. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas verdes con FP en dos localidades de las Islas de Hawaii. Los valores de actividad se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

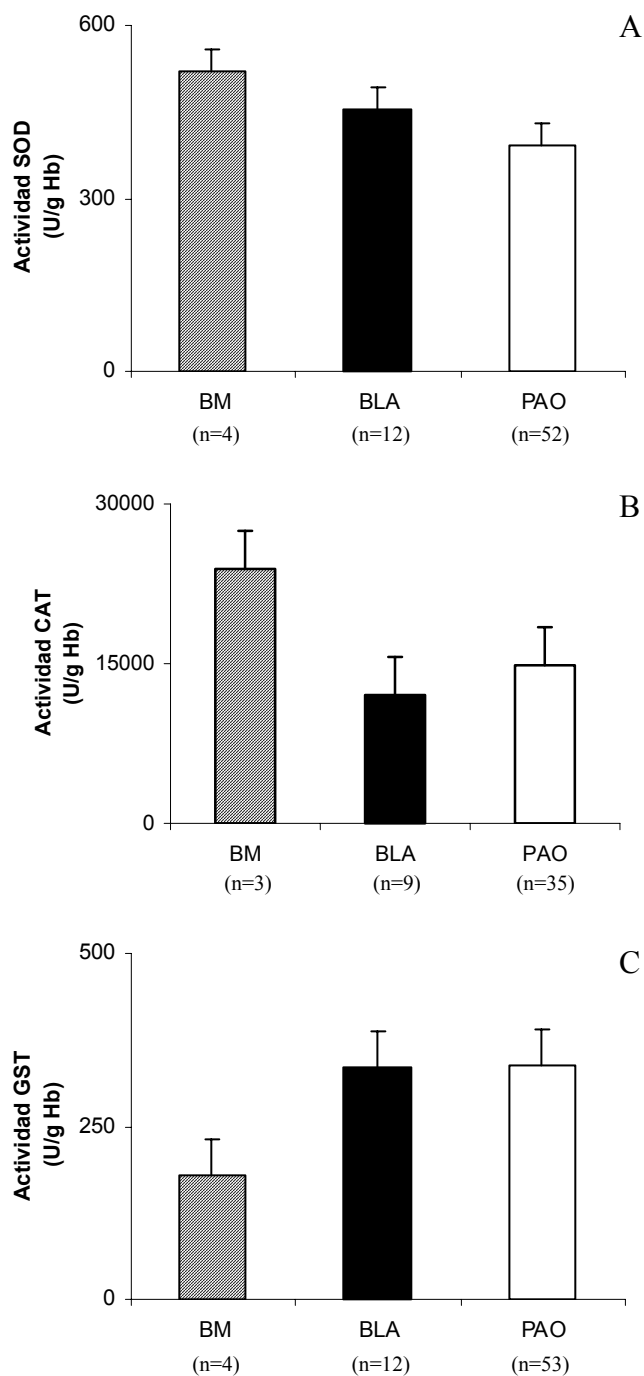


Figura 31. Actividad específica de las enzimas: A) superóxido dismutasa (SOD), B) catalasa (CAT) y C) glutatión S-transferasa (GST) en el contenido intracelular de eritrocitos de tortugas negras de tres localidades de la península de Baja California. Los valores de actividad se expresan como media \pm error estándar. n = número de muestras.

7.2. Tortugas Negras Sanas vs. Tortugas Verdes con FP

7.2.1. Tejidos

En los apéndices I y III se muestran los parámetros morfométricos evaluados de cada organismo capturado. La longitud recta de carapacho (LRC) promedio para los organismos de Hawaii fue de 59.62 ± 10.95 cm, y el peso promedio de 28.61 ± 13.58 kg, y para las tortugas de Baja California la LRC promedio fue de 58.66 ± 11.60 cm. No se presentaron diferencias significativas en el LRC de ambas poblaciones ($p=0.89$).

Por lo anterior, se considera que los grupos de edad con los que se trabajó fueron principalmente de organismos subadultos y adultos de acuerdo al U.S. Fish and Wildlife Service (1997). No fue posible obtener los pesos de las tortugas de Baja California debido a que se trató de organismos muertos en redes de pesca, a los cuales se les realizó una necropsia inmediatamente, con el fin de congelar las muestras en el menor tiempo posible.

En la Tabla III se encuentra representado un resumen de los valores promedio de todas las variables cuantificadas en los tejidos de *Chelonia mydas*.

Tabla III. Indicadores de daño oxidativo y defensas antioxidantes en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes. Los valores se representan como media \pm error estándar. A-F = diferencias significativas ($p < 0.05$), n = número de muestras. $O_2^{\cdot -}$ = radical superóxido, TBARS = peroxidación de lípidos, SOD = superóxido dismutasa, CAT = catalasa, GST = glutatión S-transferasa.

Indicadores	Corazón	Hígado	Músculo	Pulmón	Riñón	Tumores
$O_2^{\cdot -}$ (nmoles/min*g)	0.04 \pm 0.004 ^A (n = 16)	0.1 \pm 0.03 ^B (n = 15)	0.1 \pm 0.01 ^B (n = 17)	0.09 \pm 0.01 ^B (n = 8)	0.05 \pm 0.01 ^A (n = 15)	0.09 \pm 0.02 ^B (n = 8)
TBARS (nmoles/g)	64.3 \pm 11.6 ^A (n = 15)	121.3 \pm 20.8 ^B (n = 16)	63.7 \pm 7.4 ^A (n = 17)	43.4 \pm 9.3 ^A (n = 7)	51.9 \pm 11.2 ^A (n = 15)	160.2 \pm 11.7 ^B (n = 10)
SOD (U/mg prot)	22.05 \pm 3.7 ^A (n = 16)	35.1 \pm 4.7 ^A (n = 16)	24.1 \pm 2.5 ^A (n = 18)	12.1 \pm 1.5 ^B (n = 5)	13.1 \pm 3.4 ^B (n = 11)	44.3 \pm 11.7 ^A (n = 10)
CAT (U/mg prot)	8.9 \pm 1.2 ^A (n = 14)	78.1 \pm 12.2 ^B (n = 16)	5.6 \pm 0.8 ^C (n = 14)	3.7 \pm 0.4 ^C (n = 6)	63.6 \pm 8.5 ^B (n = 12)	32.6 \pm 5.7 ^D (n = 10)
GST (mU/mg prot)	102.6 \pm 18.1 ^A (n = 16)	1032.2 \pm 147.5 ^B (n = 16)	210.3 \pm 17.5 ^C (n = 19)	68.6 \pm 9.2 ^D (n = 7)	457.7 \pm 49.4 ^E (n = 14)	154.9 \pm 34.9 ^F (n = 9)

7.2.1.1. Producción de Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Los resultados obtenidos muestran que el corazón presentó una tasa de producción de $O_2^{\cdot-}$ de 0.04 ± 0.01 nmoles/min*g peso húmedo, la cual es significativamente menor que la que presentan tejidos como el hígado (en un 72.4%, $p=0.02$), el músculo (en un 63.3%, $p<0.0001$), el pulmón (en un 60.1%, $p=0.001$) y los tumores (59.6%, $p=0.002$) (Fig. 32, Tabla III). Lo mismo se repite con el riñón, el cual también presentó una menor producción de $O_2^{\cdot-}$ con respecto a tejidos como el hígado (en un 66.2%, $p=0.03$), el músculo (en un 54.9%, $p<0.0001$), el pulmón (en un 51.1%, $p=0.01$) y los tumores (en un 50.3%, $p=0.02$), con una tasa de 0.04 ± 0.003 nmoles/min*g peso húmedo (Fig. 32, Tabla I). El corazón y el riñón no presentaron diferencias significativas entre sí. Tampoco se observaron diferencias entre el hígado, músculo, pulmón y tumores.

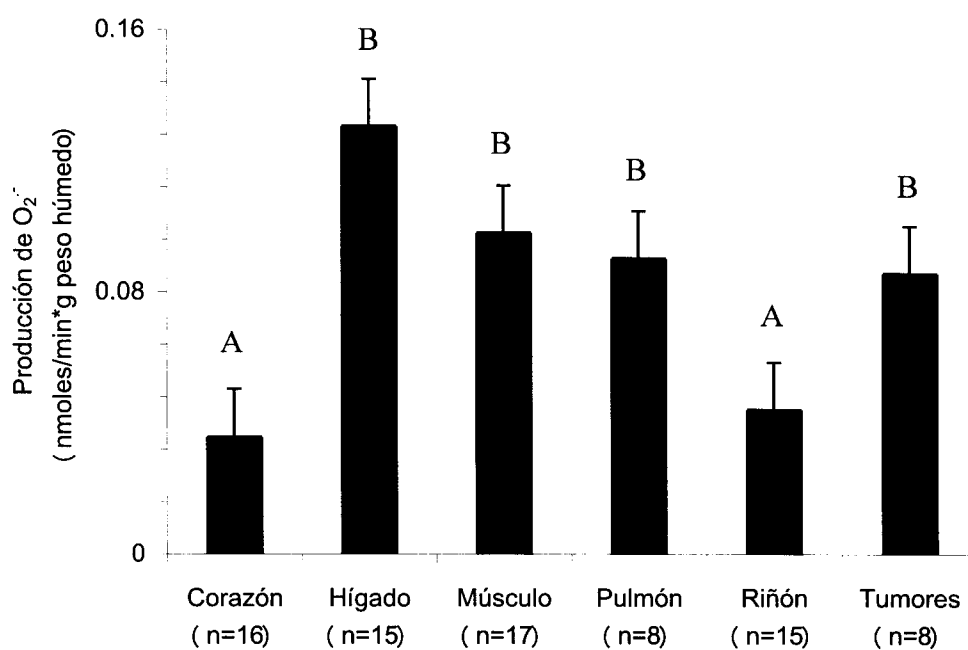


Figura 32. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes. Los valores graficados se expresan como media \pm error estándar. Diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre A y B. n = número de muestras.

7.2.1.2. Peroxidación de Lípidos (TBARS)

En cuanto a los resultados que se obtuvieron, el tejido hepático presentó niveles elevados de TBARS; en un 47% más que el corazón ($p=0.03$), 64.2% más que el pulmón ($p=0.02$) y 57.1% más que el riñón ($p=0.005$), con valores de 121.3 ± 20.8 nmoles/g peso húmedo (Fig.33, Tabla III). Además, se apreció la tendencia no significativa del hígado de presentar una mayor peroxidación de lípidos que el músculo ($p=0.06$), pero menor que los tumores ($p=0.06$), sugiriendo que los tumores presentan un mayor daño a tejidos. Los tumores presentaron valores de TBARS de 160.2 ± 11.7 nmoles/g peso húmedo, siendo estadísticamente más altos que los que presentan el corazón (en un 59.9%, $p<0.0001$), el músculo (en un 60.2%, $p<0.0001$), el pulmón (72.9%, $p<0.0001$) y el riñón (67.5%, $p<0.0001$) (Fig. 33, Tabla III).

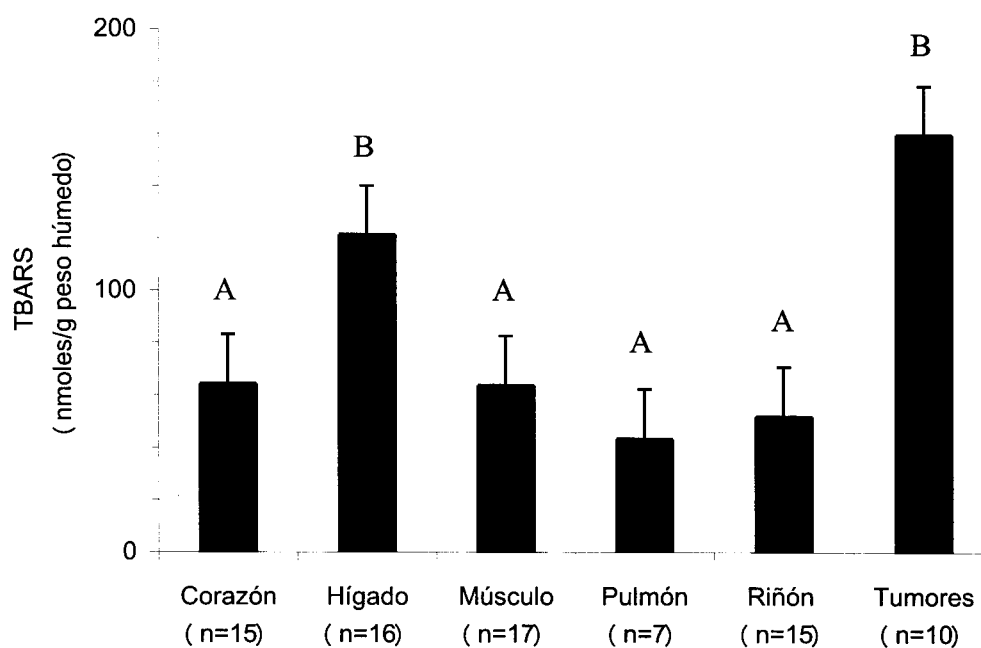


Figura 33. Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes. Los valores graficados se presentan como media \pm error estándar. Diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre A y B. n = número de muestras.

7.2.1.3. Enzimas Antioxidantes

7.2.1.3.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

Los datos concernientes a la SOD muestran que el pulmón presenta significativamente menor actividad que el hígado (en un 65.7%, $p=0.001$), el músculo (en un 50.1%, $p=0.02$) y los tumores (en un 72.8%, $p=0.03$), ya que su actividad es de 12.1 ± 1.5 U/mg proteína (Fig. 34, Tabla III). Por otra parte y también mostrando niveles de actividad de la SOD disminuidos (13.1 ± 3.4 U/mg proteína) se encuentra el riñón, el cual resultó ser 62.7% menor que el hígado ($p=0.001$), 45.8% menor que el músculo ($p=0.01$) y 45.6 % menor que los tumores ($p=0.02$) (Fig. 34, Tabla III). El corazón, el pulmón y el hígado no presentaron diferencias significativas entre ellos, tampoco se observaron diferencias entre el corazón, el hígado, el músculo y los tumores (Fig. 34).

Una observación importante es que el patrón de actividad de SOD que presentan los tejidos, es casi el mismo que presentan en los resultados de peroxidación de lípidos (Figs. 33 y 34, Tabla III).

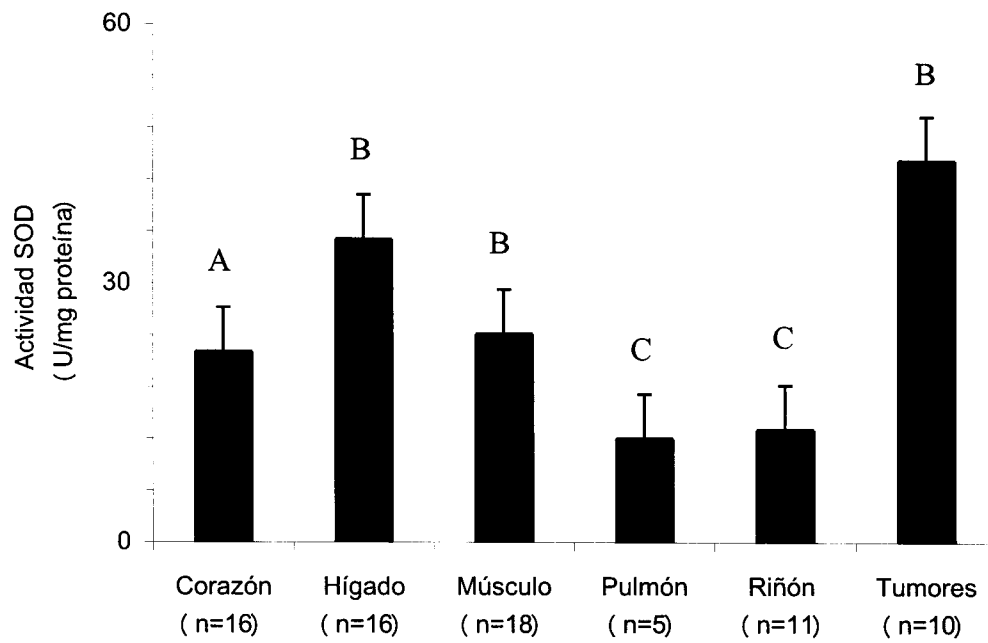


Figura 34. Actividad específica de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes. Los valores graficados se expresan como media \pm error estándar. Diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre B y C. n = número de muestras.

7.2.1.3.2. Catalasa (CAT)

El hígado y el riñón presentaron la actividad más elevada de la enzima CAT con respecto a los otros tejidos (78.1 ± 12.2 y 63.6 ± 8.5 U/mg proteína, respectivamente), sin mostrar diferencias significativas entre ellos (Fig. 35, Tabla III). El hígado resultó tener un 88.65% más actividad que el corazón ($p < 0.0001$), 92.9% más que el músculo ($p < 0.0001$), 95.3% más que el pulmón ($p < 0.0001$) y 58.2% más que los tumores ($p = 0.002$) (Fig. 35). El riñón mostró un 86.05% más actividad de GST con respecto al corazón ($p < 0.0001$), 91.2% en comparación del músculo ($p < 0.0001$), 94.2% con respecto al pulmón ($p = 0.0001$) y 48.7% en comparación con los tumores ($p = 0.01$) (Fig. 35).

Los tumores resultaron ser significativamente diferentes al resto de los tejidos y mostraron tener una actividad de GST un 72.8% mayor que el corazón ($p = 0.0003$), 82.9% mayor que el músculo ($p < 0.0001$), y 88.7% mayor que el pulmón ($p = 0.0002$) (Fig. 35, Tabla III). El corazón de las tortugas verdes también se muestra estadísticamente diferente al resto de los tejidos, presentando una actividad mayor que el pulmón en un 58.3% ($p = 0.03$), y que el músculo en un 37.2% ($p = 0.05$).

El músculo y el pulmón no mostraron diferencias significativas entre sí, y son los tejidos que presentan una menor actividad de CAT (5.6 ± 0.8 y 3.7 ± 0.4 U/mg proteína, respectivamente) (Fig. 35, Tabla III).

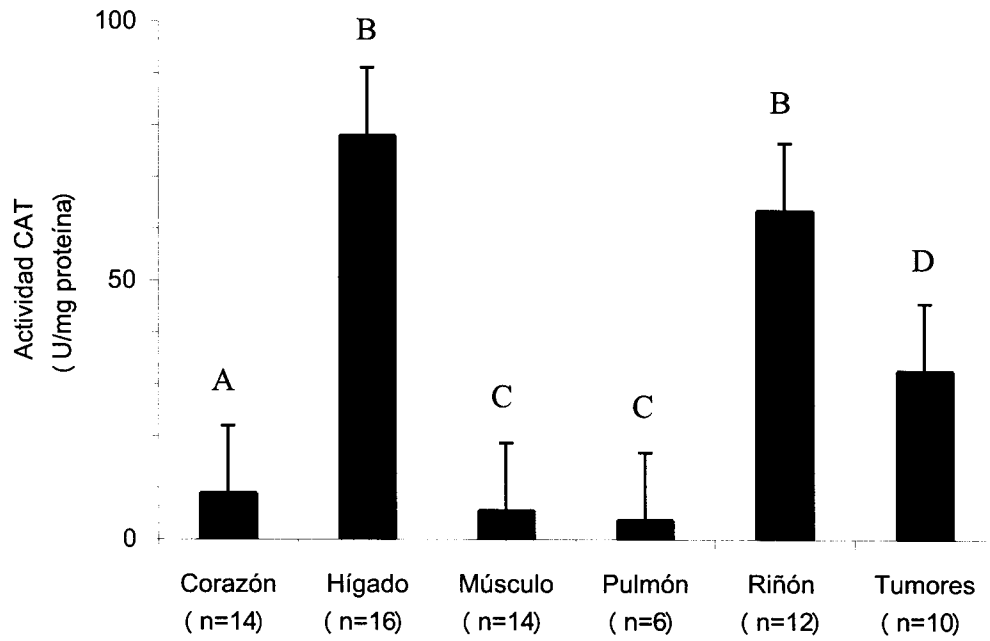


Figura 35. Actividad específica de la enzima Catalasa (CAT) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes. Los valores graficados se muestran como media \pm error estándar. Diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre A, B, C y D. n = número de muestras.

7.2.1.3.3. Glutación S-transferasa (GST)

En cuanto a la glutatión S-transferasa, se encontró que el hígado tiene los niveles de actividad más elevados (1032.2 ± 147.5 mU/mg proteína) y es estadísticamente diferente al resto de los tejidos; 90.1% más que el corazón ($p < 0.0001$), 79.6% más que el músculo ($p < 0.0001$), 93.45 más que el pulmón ($p < 0.0001$), 55.7% más que el riñón ($p = 0.001$) y 84.9% más que los tumores ($p < 0.0001$) (Fig. 36, Tabla III). El riñón presenta la actividad de GST más elevada después del hígado (457.7 ± 49.4 mU/mg proteína), con un 77.6% más actividad que el corazón ($p < 0.0001$), 54.1% más que el músculo ($p < 0.0001$), 85.01% más que el pulmón ($p < 0.0001$) y 66.2% más que los tumores ($p = 0.0002$) (Fig. 36, Tabla III). Por otra parte, el músculo resultó tener niveles más elevados de GST que el corazón (en un 51.2%, $p < 0.0001$) y que el pulmón (en un 67.4%, $p < 0.0001$) (Fig. 36). En cuanto a los tumores, éstos resultaron tener un 55.7% más actividad de GST que el pulmón ($p = 0.04$) (Fig. 36).

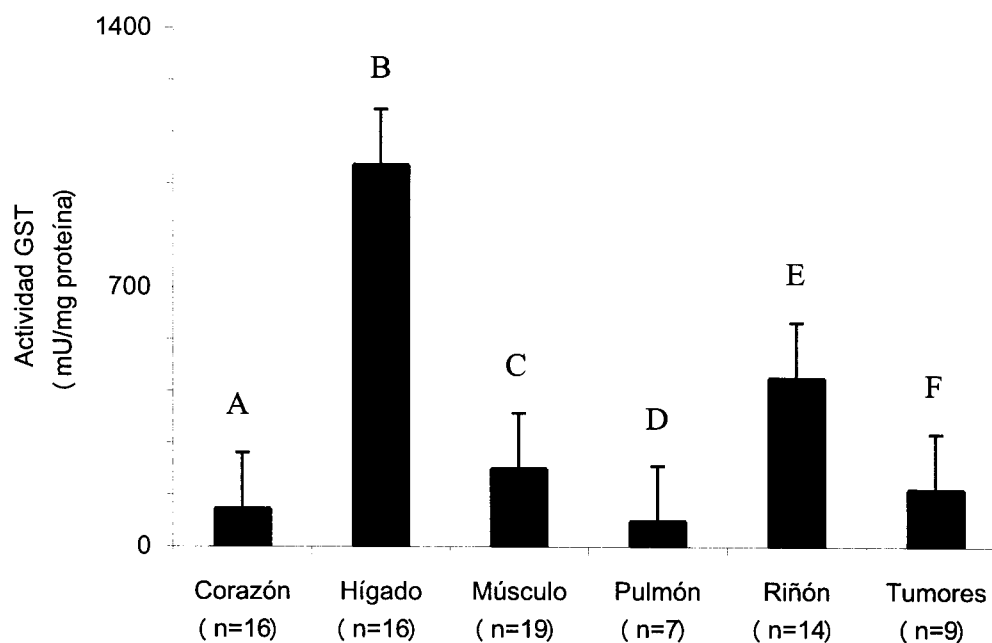


Figura 36. Actividad específica de la enzima Glutathión S-transferasa (GST) en diferentes tejidos de tortugas negras y verdes. Los valores graficados se expresan como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$), A= diferente a B, C y E. B= diferente a A, C, D, E y F. C= diferente a A, B, D y E. D= diferente a B, C, E y F. E= diferente a A, B, C, D y F. F= diferente a B, D y E. n = número de muestras.

7.2.1.4. Análisis de Funciones Discriminantes

Los resultados muestran que el análisis no eliminó ninguna de las variables, es decir, todas resultaron ser importantes porque contribuyen, en parte, a la explicación de la varianza (Tabla IV).

Se obtuvieron en total 5 raíces, explicándose el 94.76% de la varianza con las dos primeras (Tabla IV). En la raíz 1 tuvieron una mayor contribución la producción de O_2^- y la CAT. Con esta raíz se definieron dos grupos principales: por una parte el grupo del hígado, el cual presentó los valores más elevados de O_2^- y CAT, y por otra parte, con los valores más bajos de CAT; el corazón, el músculo y el pulmón juntos formando un grupo aparte. En la raíz 2, las variables que contribuyeron más a explicar la varianza fueron la TBARS y la SOD, a partir de las cuales se separaron otros dos grupos: el grupo del riñón, presentando los valores más bajos de TBARS y SOD, y el grupo de los tumores, presentando los valores más elevados de las variables antes mencionadas (Fig. 37 y Tabla IV).

Tabla IV. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas. $O_2^{\cdot-}$ = radical superóxido, TBARS = peroxidación de lípidos, SOD = superóxido dismutasa, CAT = catalasa, GST = glutatión S-transferasa, Prop. Acum. = proporción acumulada.

Variable	Raíz 1	Raíz 2	Raíz 3	Raíz 4	Raíz 5
$O_2^{\cdot-}$	0.8694	0.3513	-0.3427	-0.7648	0.1189
TBARS	0.5299	0.6473	0.3269	0.2026	0.5589
SOD	0.0079	0.7542	0.0042	0.0941	-0.7620
CAT	0.8067	-0.3839	0.6379	-0.6600	-0.1641
GST	0.3818	-0.3205	-0.5788	0.8008	0.0931
Eigenvalor	4.1056	1.0388	0.2007	0.0766	0.0072
Prop. Acum.	0.7563	0.9476	0.9846	0.9987	1

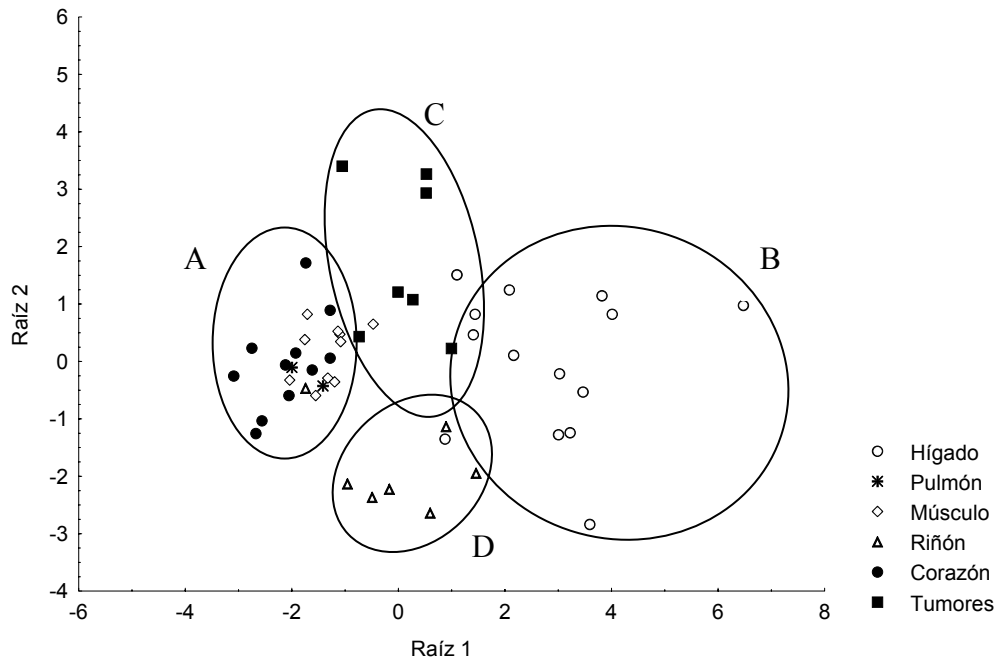


Figura 37. Análisis discriminante del metabolismo oxidativo de tejidos de tortugas negras y verdes: grupos formados por la raíz 1 (eje de abscisas) (A, B) y la raíz 2 (eje de ordenadas) (C, D). El corazón , músculo y pulmón se encuentran juntos formando un grupo (A), mientras que el hígado (B), los tumores (C) y el riñón (D) forman cada uno un grupo independiente (ver detalles en el texto).

7.2.2. Sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron de organismos juveniles y subadultos (U.S. Fish and Wildlife Service, 1997); las tortugas de Hawaii con FP presentaron una LRC promedio de 59.62 ± 10.95 cm , y un peso promedio de 28.61 ± 13.58 kg, mientras que las tortugas sanas de Hawaii presentaron 47.91 ± 10.00 cm de LRC promedio, y 21.73 ± 4.54 kg de peso promedio. Las tortugas de Baja California en promedio tuvieron una LRC de 59.49 ± 10.01 cm y un peso de 31.08 ± 17.46 kg (apéndicex II y III). No se encontraron diferencias significativas en la LRC de las tortugas negras y verdes con FP ($p=0.87$), no obstante, las tortugas verdes sin FP resultaron ser significativamente más pequeñas que las tortugas verdes con FP de esta misma localidad ($p=0.02$), y que las tortugas negras ($p=0.001$).

7.2.2.1. Enzimas Antioxidantes

En la Tabla V se encuentran los valores promedio de las variables evaluadas en la sangre de tortugas verdes.

Tabla V. Enzimas antioxidantes en sangre de tortugas marinas con y sin fibropapilomas (FP). Los valores se representan como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$), n = número de muestras. SOD = superóxido dismutasa, CAT = catalasa, GST = glutatión S-transferasa. Sin FP (Hawaii) = tortugas verdes sin FP de las Islas de Hawaii, Con FP (Hawaii) = tortugas verdes con FP de las Islas de Hawaii, Sin FP (Baja) = tortugas negras sin FP de Baja California.

Condición	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GST (U/mg prot)
Sin FP (Hawaii)	177.2 \pm 83.1 (n = 5)	5177.2 \pm 993.2 (n = 3)	162.2 \pm 74.2 (n = 3)
Con FP (Hawaii)	102.9 \pm 16.9 (n = 10)	4656.6 \pm 998.3 (n = 10)	94.9 \pm 8.9 (n = 11)
Sin FP (Baja)	411.5 \pm 20.5* (n = 68)	14887.2 \pm 1106.6* (n = 47)	327.5 \pm 23.4* (n = 71)

7.2.2.1.1. Superóxido Dismutasa (SOD)

En los resultados obtenidos de la cuantificación de la enzima SOD en el material intracelular de eritrocitos, se puede observar que no existen diferencias significativas entre las tortugas verdes sanas (control geográfico) y enfermas (con FP) de las Islas de Hawaii.

Las tortugas negras de Baja California resultaron tener una actividad de SOD significativamente más elevada que las tortugas verdes sin FP de Hawaii (en un 56.9%, $p=0.01$), y que las tortugas verdes con FP de Hawaii (en un 74.9%, $p=8 \times 10^{-10}$), presentando una actividad media de 411.5 ± 20.5 U/g Hb (Fig.38, Tabla V).

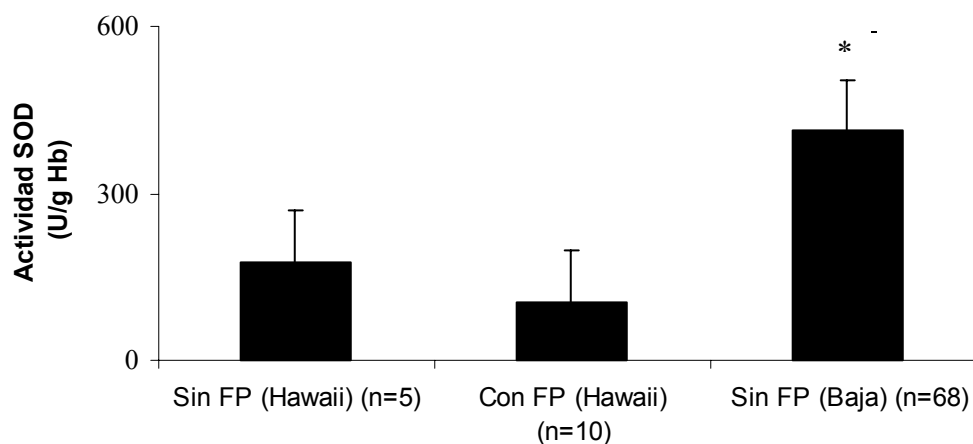


Figura 38. Actividad específica de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) en sangre de tortugas marinas con y sin FP. Los valores graficados se expresan como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$), n = número de muestras. Sin FP (Hawaii) = tortugas verdes sin FP de las Islas de Hawaii, Con FP (Hawaii) = tortugas verdes con FP de las Islas de Hawaii, Sin FP (Baja) = tortugas negras sin FP de Baja California.

7.2.2.1.2. Catalasa (CAT)

En esta sección se observó que las tortugas negras sin FP de Baja California presentaron rangos de actividad de la enzima CAT estadísticamente más elevados con respecto a las tortugas verdes de las Islas de Hawaïi, tanto las sanas (en un 65.2%, $p=0.01$), como las que tienen FP (68.7%, $p=2.3 \times 10^{-6}$), presentando una actividad de 14887.2 ± 1106.6 U/g Hb (Fig. 39, Tabla V).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la CAT en las tortugas verdes de las Islas de Hawaïi, con y sin fibropapilomatosis, incluso, los valores fueron muy semejantes (Fig. 39, Tabla V).

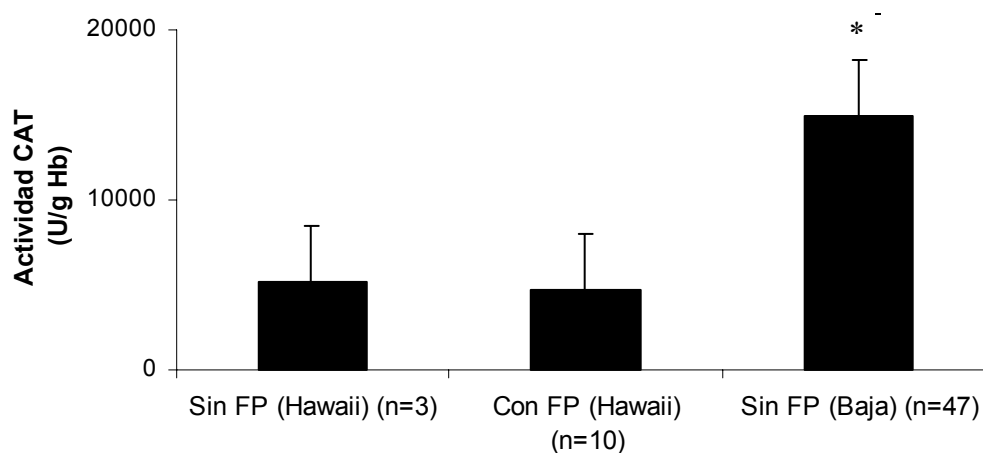


Figura 39. Actividad específica de la enzima catalasa (CAT) en sangre de tortugas marinas con y sin FP. Los valores graficados se muestran como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$), n = número de muestras. Sin FP (Hawaii) = tortugas verdes sin FP de las Islas de Hawaïi, Con FP (Hawaii) = tortugas verdes con FP de las Islas de Hawaïi, Sin FP (Baja) = tortugas negras sin FP de Baja California.

7.2.2.1.3. Glutación S-transferasa (GST)

Los resultados obtenidos para la enzima GST fueron muy similares a los encontrados para la SOD y CAT: las tortugas negras sin FP de la Península de Baja California, mostraron una actividad de GST en el contenido intracelular de eritrocitos estadísticamente mayor a las tortugas verdes de Hawaii con FP (en un 71.02%, $p < 0.0001$) y sin FP (en un 50.5%, $p = 0.01$), presentando una actividad de 327.5 ± 23.4 U/g Hb (Fig. 40 y Tabla V).

Del mismo modo, las tortugas verdes enfermas (con FP) de las Islas de Hawaii, no presentaron diferencias significativas con respecto a las tortugas verdes sanas de la misma localidad. (Fig. 40 y Tabla V).

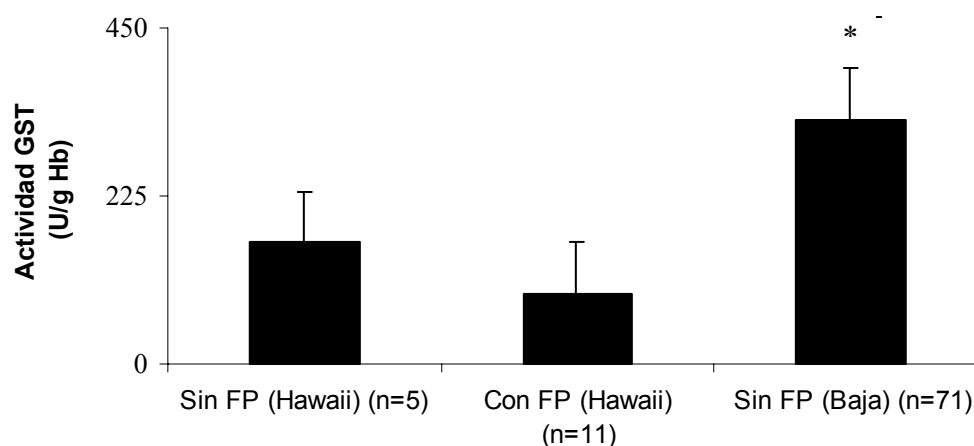


Figura 40. Actividad específica de la enzima glutatión S-transferasa (GST) en sangre de tortugas marinas con y sin FP. Los valores graficados se muestran como media \pm error estándar. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$), n = número de muestras. Sin FP (Hawaii) = tortugas verdes sin FP de las Islas de Hawaii, Con FP (Hawaii) = tortugas verdes con FP de las Islas de Hawaii, Sin FP (Baja) = tortugas negras sin FP de Baja California.

7.3. Comparación Con Otros Reptiles

Con el fin de apreciar si el metabolismo oxidativo de las tortugas negras es similar al de otros reptiles, se procedió a hacer una tabla comparativa entre los datos obtenidos en este estudio y los datos reportados por otros autores en otros reptiles como lo son la serpiente liga (*Thamnophis sirtalis parietalis*) y la tortuga de agua dulce (*Trachemys scripta elegans*) (Tabla VI).

7.3.1 Peroxidación de Lípidos (TBARS)

En cuanto a la peroxidación de lípidos, tanto *T. s. elegans* como *C. m. agassizii* mostraron tener mayores niveles de TBARS en el hígado con respecto a los demás tejidos. El hígado de *T. s. elegans* contiene 70% más TBARS que el riñón, y 94.1% y 86.6% con respecto a los músculos blanco y rojo, respectivamente. En el caso de *C. m. agassizii*, el hígado contiene 57.1% más TBARS con respecto al riñón, y 47.5% más que el músculo pectoral (Tabla VI). Por otra parte, los niveles de TBARS en el riñón de *T. s. elegans* son mayores en un 53.9% y un 79.8% a los músculos rojo y blanco, respectivamente, mientras que en *C. m. agassizii*, la relación es inversa: el músculo pectoral presenta un 18.5% más que el riñón (Tabla VI).

7.3.2. Superóxido Dismutasa (SOD)

La SOD del hígado de *T. s. elegans* mostró 39.5% más actividad que el corazón, en *C. m. agassizii* ocurrió algo muy similar (37.2% más actividad del hígado con respecto al corazón) (Tabla VI). A su vez, el hígado mostró una elevada actividad con respecto al músculo en las tres diferentes especies: 59.03% en el caso de *T. s. parietalis*, 56.9% y

29.8% en el músculo rojo y blanco, respectivamente, de *T. s. elegans*, y 31.3% en *C. m. agassizii*. El hígado de *C. m. agassizii* resultó tener un 62.7% más actividad que el riñón, sin embargo, en *T. s. elegans*, el riñón mostró una actividad levemente más elevada que el hígado (1.6%) (Tabla VI). El riñón de *C. m. agassizii* resultó tener un 45.8% menos actividad que el músculo, mientras que el riñón de *T. s. elegans* presentó una actividad mayor que los músculos rojo y blanco (57.7% y 30.9%, respectivamente) (Tabla VI). En cuanto al corazón, éste resultó tener un 40.5% menos actividad de SOD que el riñón de *T. s. elegans*, mientras que en *C. m. agassizii* mostró un 40.6% más actividad. A su vez, el corazón de *T. s. elegans* mostró 28.9% más actividad de SOD que el músculo rojo, y un 13.8% menos que el músculo blanco, mientras que en *C. m. agassizii* presentó un 8.5% menos actividad que el músculo (Tabla VI).

7.3.3. Catalasa (CAT)

Esta enzima resultó tener una mayor actividad en el hígado de las tres especies con respecto a los demás tejidos (excepto en *T. s. elegans*, donde es igual a la del riñón): en el caso de *T. s. parietalis*, presentó un 68.1% más actividad que el músculo, en el caso de *T. s. elegans* mostró una actividad 79.2% más que el corazón, 79.5% más que el músculo rojo, 75% más que el músculo blanco, y una actividad igual que el riñón. Con respecto a *C. m. agassizii*, el hígado presentó una actividad 88.6% más elevada que el corazón, 92.9% más que el músculo y 18.5% más que el riñón (Tabla VI). El riñón presentó la misma actividad que el hígado en *T. s. elegans* un 79.2% más actividad que el corazón, 79.5% más que el músculo rojo, y 75.9% más que el músculo blanco, mientras que en *C. m. agassizii* mostró un 86.05% más actividad que el corazón, y un 91.2% más que el músculo (Tabla VI). En

cuanto al corazón, éste presentó una actividad de SOD parecida a la del músculo rojo de *T. s. elegans* (1.5% de diferencia), y un poco menor que el músculo blanco (13.5%), mientras que en *C. m. agassizii* mostró un 37.2% más actividad que el músculo (Tabla VI). En general, el rango de actividad de CAT que se aprecia en *T. s. elegans* es mayor que el que se obtuvo de *C. m. agassizii*.

7.3.4. Glutación S-transferasa (GST)

El hígado de *T. s. parietalis* resultó poseer 90.8% más actividad de GST que el músculo, mientras que en *T. s. elegans* el hígado mostró aproximadamente un 80.9% más actividad que el corazón, el músculo rojo y el músculo blanco, esta tortuga de agua dulce mostró una mayor actividad del riñón con respecto al hígado (48.8%), y aproximadamente un 90.2% con respecto al corazón, al músculo rojo y al músculo blanco (Tabla VI). El hígado de *C. m. agassizii*, presentó una mayor actividad de GST que todos los demás tejidos: 90.1% más actividad que el corazón, 79.6% que el músculo, y 55.7% que el riñón (Tabla VI). En *C. m. agassizii* el riñón presentó 77.6% más actividad que el corazón, y 54.1% más que el músculo (Tabla VI). El rango de actividad de GST de *C. m. agassizii* mostró valores menores que *T. s. elegans*, pero mayores de *T. s. parietalis* (Tabla VI).

Tabla VI. Tabla comparativa del metabolismo oxidativo en diferentes órganos de algunos reptiles incluyendo a la tortuga negra (*Chelonia mydas agassizii*), la tortuga de agua dulce (*Trachemys scripta elegans*) y la serpiente (*Thamnophis sirtalis parietalis*). Los resultados se muestran como media \pm error estándar.

Especie	Tejido	TBARS (nmoles/g)	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GST (mU/mg prot)	Referencia
<i>T.s. parietalis</i>	Hígado	-	8.3 \pm 0.7	71.8 \pm 5.5	638.0 \pm 77.0	Hermes-Lima y Storey (1993)
	Músculo	-	3.4 \pm 0.2	22.9 \pm 2.8	59.0 \pm 7.0	
<i>T.s. elegans</i>	Corazón	-	29.4 \pm 1.5	47.6 \pm 3.0	< 400	Modificado de Willmore y Storey (1997 a, b)
	Hígado	71.0 \pm 14.1	48.6 \pm 5.8	229.0 \pm 8.4	2 100 \pm 300	
	Músculo Rojo	9.54 \pm 0.9	20.9 \pm 2.7	46.9 \pm 7.4	< 400	
	Músculo Blanco	4.19 \pm 0.8	34.1 \pm 22	55.0 \pm 5.6	< 400	
	Riñón	20.7 \pm 1.4	49.4 \pm 4.1	229.0 \pm 12.4	4 100 \pm 200	
<i>C.m. agassizii</i>	Corazón	64.3 \pm 11.6	22.05 \pm 3.7	8.9 \pm 1.2	102.6 \pm 18.1	Este trabajo
	Hígado	121.3 \pm 20.8	35.1 \pm 4.7	78.1 \pm 12.2	1 032.2 \pm 147.5	
	Músculo	63.7 \pm 7.4	24.1 \pm 2.5	5.6 \pm 0.8	210.3 \pm 17.5	
	Pulmón	43.4 \pm 9.3	12.1 \pm 1.5	3.7 \pm 0.4	68.6 \pm 9.2	
	Riñón	51.9 \pm 11.2	13.1 \pm 3.4	63.6 \pm 8.5	457.7 \pm 49.4	

8. DISCUSIÓN

8.1. Factores Bióticos y Abióticos

Stegeman *et al.*, (1992) mencionan que se le ha restado importancia a una serie de factores que pudieran estar afectando los procesos oxidativos, los cuáles pueden ser biológicos como la edad, sexo, desarrollo, reproducción, y nutrición, o pueden ser ambientales como la temperatura, salinidad, contenido de oxígeno disuelto, estación, y fotoperíodo. De acuerdo a ello, se hicieron una serie de comparaciones entre las tortugas marinas estudiadas con el fin de apreciar algunas de las fuentes de variabilidad en su metabolismo oxidativo.

8.1.1. Edad

Las tortugas negras adultos mostraron un 56.6% más niveles de TBARS en el riñón con respecto a los subadultos (Fig. 14), lo cual puede deberse a la acumulación del daño oxidativo con la edad (Sastre *et al.*, 2003). Por otra parte, se sabe que la expresión de GST es regulada por el desarrollo (en Tsuchida y Sato, 1992), sin embargo, los resultados obtenidos con respecto a esta enzima, no muestran diferencias significativas por grupos de edad en los tejidos, ni en la sangre (Figs. 15C y 16C), lo cual es similar a lo que reportan Stegeman *et al.*, (1992) quienes tampoco encontraron diferencias en la actividad de la GST en peces maduros e inmaduros. Los resultados fueron apoyados por el análisis de regresión que se hizo con respecto a la LRC (como indicador de edad) y los diferentes

parámetros evaluados en sangre y tejidos de la tortuga verde, donde no se encontró ninguna correlación (Tabla I).

8.1.2. Sexo

No se observaron diferencias por género en las tortugas negras (Fig. 17), aunque los machos tienden (no significativamente) a tener una mayor actividad de GST que las hembras ($p=0.06$) (Fig. 17), lo cual va de acuerdo a estudios hechos en el pez *Pleuronectes platessa*, en el cual los machos presentan hasta el doble de actividad de GST microsomal y citosólica que las hembras durante los meses de marzo y abril (en Stegeman *et al.*, 1992). Por otra parte se han encontrado diferencias sexuales en la composición de subunidades de la GST en ratones (en Tsuchida y Sato, 1992).

8.1.3. Grado de Severidad de la Fibropapilomatosis (FPS)

Mantovanni *et al.* (2002) encontraron que la SOD en la sangre de pacientes con cáncer iba incrementando significativamente del estado II-ECOG 0-1 al estado IV-ECOG 0-1 pero decreciendo en el estado IV-ECOG 0-3. Sin embargo, en tortugas verdes no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los parámetros evaluados y los diferentes FPS, ni en el tejido tumoral, ni en la sangre (Figs. 20 y 21). Sin embargo, se apreció una tendencia interesante en la SOD, ya que disminuye su actividad conforme incrementa el FPS en los tumores, mientras que en la sangre se observa una relación inversa, es decir, la actividad de SOD aumenta conforme aumenta el FPS (Figs. 20A y 21A).

8.1.4. Estaciones del Año

Se encontraron algunas diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes con respecto a las estaciones del año en las tortugas negras colectadas en Baja California; la SOD y la GST presentaron una menor actividad en verano en el músculo pectoral (<56.2% y <47.9%, respectivamente) con respecto a la primavera y el invierno (Figs. 24A y 24C), mientras que la CAT en el hígado se mostró 63.5% más elevada en invierno (Fig. 24B), y la GST en la sangre se encontró <54.6% incrementada en otoño (Fig. 25C). Lo anterior es apoyado por algunos estudios como el del pez *Pleuronectens platessa* (en Stegeman *et al.*, 1992), en donde encontraron diferencias en la actividad de GST dependiendo del mes de colecta. Otros autores, como Viarengo *et al.* (1991), y Power y Sheehan (1996), han encontrado que la actividad de las defensas antioxidantes en diferentes tejidos de mejillones en general presenta una reducción en invierno, a excepción de la enzima GST, la cual es más activa. Esto se relaciona con el estado fisiológico del animal, lo cual depende de varios factores como la disponibilidad del alimento (Viarengo *et al.*, 1991; Power y Sheehan 1996). Lo anterior se confirma en el estudio realizado por López-Mendilaharsu (2002), donde se encontró que la disponibilidad de alimento para las tortugas negras varía con las estaciones del año en Bahía Magdalena, B.C.S.; lo cual, es muy probable que esté afectando las diferencias de expresión enzimática encontradas en este estudio.

Las diferencias en el metabolismo oxidativo con respecto a las estaciones del año tienen relación directa con la temperatura, lo cual conlleva a presentar diferentes conductas en los organismos, tales como la hibernación y la estivación, en los cuales, se producen eventos de isquemia-reperfusión en los que se rompe el equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes debido a la entrada intensiva de oxígeno, lo que genera una gran actividad

de radicales libres (Drossos *et al.*, 1994). En relación a lo anterior, se ha estudiado el metabolismo oxidativo en caracoles de tierra que estivan (Hermes-Lima *et al.*, 1998), insectos tolerantes a bajas temperaturas (Joanisse y Storey, 1996), ranas tolerantes a la deshidratación (Hermes-Lima y Storey, 1996), y culebras que soportan el congelamiento (Storey, 1996a; Hermes-Lima y Storey, 1993). En todos estos estudios se ha observado que los organismos presentan mecanismos de preparación para enfrentar los cambios en el ambiente, entre otras cosas, un incremento de las defensas antioxidantes. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, sobretodo en relación a las diferencias encontradas en las estaciones más frías, ya que se ha observado que las tortugas negras presentan un comportamiento similar al de hibernación en la península de Baja California (Ogren y McVea Jr., 1995).

8.1.5. Localidad

En cuanto a las evaluaciones por localidades específicas de colecta, se encontró en tejido tumoral un 48.5% más actividad de la enzima CAT en las muestras obtenidas en la Bahía Kaneohe con respecto a las de Bahía Kailua en Hawaii (Fig. 28B), no obstante, en las muestras de sangre no se encontró ninguna diferencia significativa. Es posible pensar que las diferencias encontradas se deban a que la mayoría de los tumores en Kaneohe presentaron un FPS=3, mientras que las de Kailua presentaron un FPS=1-3 (Apéndice III), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la CAT de los tumores con respecto al FPS (Fig. 20B), ni hubo una correlación entre ellos ($R^2=0.3$) (Tabla II).

8.2. Metabolismo Oxidativo en Tejidos de Tortugas Marinas

Al igual que otros reptiles tolerantes a anoxia, las tortugas marinas tienen que lidiar con las EROs producidas en su metabolismo normal, pero además con las que se producen en sus actividades de buceo como consecuencia de la isquemia-reperfusión (Storey, 1996a). Aunado a esto, las tortugas marinas son las que presentan las tasas más elevadas de consumo de O_2 y el mejor alcance aeróbico que los demás reptiles (en Lutcavage y Lutz, 1997). Sin embargo, se ha comprobado que otros organismos que bucean (como pingüinos, focas y tortugas de agua dulce) se encuentran perfectamente adaptados y presentan un sistema antioxidante que les permite tener esta manera de vida (en Zenteno-Savín, 2002; Willmore y Storey, 1996 y 1997; Storey, 1996a), lo cual se espera que ocurra en las tortugas marinas.

Como ya se mencionó anteriormente, durante los procesos de reperfusión, se genera una gran cantidad de radicales libres (Drossos *et al.*, 1994), y aunque, las EROs generadas por estos procesos no se consideran un riesgo en organismos buceadores, puede explicar en parte, los niveles de producción de O_2^- y de peroxidación de lípidos presentes en sus tejidos.

Los tejidos hepático, tumoral, renal y cardíaco de las tortugas marinas estudiadas, muestran niveles de peroxidación de lípidos proporcionales a su tasa de producción de O_2^- (Figs. 32 y 33, Tabla III), lo cual es lógico, ya que entre mayor sea la producción de O_2^- , mayor debe ser el daño que se produzca en las membranas celulares de los tejidos, ya que el O_2^- es el precursor de todas las demás EROs (en Gil del Valle *et al.*, 1999). Sin embargo, el pulmón y el músculo tienen una producción de O_2^- elevada, y el daño que presentan no es tan grande (Figs. 32 y 33, Tabla III). A su vez, en la mayoría de los tejidos (excepto en el

corazón y el pulmón) se encontró una mayor actividad de la enzima SOD entre más elevada fuera la producción de O_2^- (Figs. 32 y 34, Tabla III)., lo cual se explica debido a que esta enzima es la encargada de depurarlo a H_2O_2 .

8.2.1. Corazón

El corazón de las tortugas negras no presenta una elevada producción de O_2^- con respecto a los demás tejidos (Figs. 32, Tabla III), esto puede ser solamente producto de los ciclos de isquemia-reperfusión que ocurren normalmente como consecuencia del buceo, lo cual se sabe que ocurre, por ejemplo, en pacientes sujetos a cirugías en el corazón, en los que es necesario interrumpir la irrigación sanguínea e iniciarla repentinamente (Drossos *et al.*, 1994). La actividad de SOD presente en el corazón de las tortugas parece ser la adecuada para depurar al O_2^- , ya que los niveles de TBARS no muestran un daño elevado (Figs. 33-36, Tabla III).

8.2.2. Hígado

En el hígado de las tortugas negras se encontraron niveles muy elevados de todas las variables evaluadas (Figs. 32-36, Tablas III). Lo anterior significa que aunque este tejido presente una elevada producción de EROs y daño producido por éstas (TBARS), también tiene una actividad enaltecida de las enzimas antioxidantes encargadas de contrarrestar el daño oxidativo. Esto se explica por la elevada tasa metabólica del tejido hepático y sus funciones (Romer y Parsons, 1978; Curtis y Barnes, 1993).

El hígado fue el tejido que presentó los niveles más elevados de actividad de CAT y de GST con respecto a los demás tejidos (<95.3% y <93.4%, respectivamente) (Figs. 35 y

36, Tabla III), lo cual se explica debido a que este órgano es un depósito de hierro, y si el hierro actúa con el H_2O_2 mediante la reacción de Fenton (Fig. 4:1), entonces formaría radicales OH \cdot , los más dañinos de todos, por lo que ese puede ser el motivo de que la actividad de la CAT sea tan alta en este órgano. Por otra parte, se sabe que el hígado es la fuente principal de GST en los vertebrados y que en él se presentan una mayor actividad y formas moleculares (Stegeman *et al.*, 1992; Tsuchida y Sato, 1992). Esta enzima es tan elevada en el hígado debido a que es el principal órgano detoxificador, proceso que en parte se lleva a cabo gracias a la acción de esta enzima que se encarga de conjugar a los agentes electrófilos con el GSH para facilitar su eliminación (Habig y Jakoby, 1981). Cuando el hígado degrada sustancias nocivas, los subproductos se excretan hacia la bilis o la sangre; los subproductos biliares entran en el intestino y, finalmente, se eliminan del cuerpo en forma de heces (Schmidt-Nielsen, 1997). Los subproductos sanguíneos son filtrados por los riñones y se eliminan del cuerpo en forma de orina (Schmidt-Nielsen, 1997), es por ello que el hígado presenta la actividad de GST más elevada, seguido de los riñones (1032.2 ± 147.5 y 457.7 ± 49.4 U/mg proteína, respectivamente) (Fig. 36, Tabla III). Resultados similares se aprecian en los estudios hechos por Hermes-Lima (1993 y 1996) en la serpiente ligera (*Thamnophis sirtalis parietalis*) y rana leopardo (*Rana pipiens*), en las que el hígado presenta una mayor actividad de las enzimas CAT (68.1% y 99.8%, respectivamente) y GST (90.8% y 98.1%, respectivamente) con respecto al músculo. La actividad de la CAT se mostró <98.7% más elevada en el riñón y el músculo del pez oro (*Carassius auratus*), sin embargo, en esta especie la GST resultó tener un 12.2% más actividad en el riñón que en el hígado (Lushchak *et al.*, 2001)

8.2.3. Músculo

Además de la isquemia-reperfusión, otros factores también pueden estar contribuyendo a la producción de O_2^- en los tejidos (Fig.32), por ejemplo, el músculo pectoral de las tortugas negras tiene un elevado metabolismo como consecuencia de las adaptaciones que le permiten realizar largas migraciones (U.S. Fish and Wildlife Service, 1997), lo cual conlleva a un elevado consumo de oxígeno, además de tener una engrandecida cantidad de mitocondrias en sus fibras (Persky *et al.*, 2000). Las enzimas antioxidantes están actuando sobre las EROs generadas, ya que el daño a tejidos encontrado no es considerable, a pesar de que aparentemente, la enzima CAT tenga una baja actividad con respecto a los demás tejidos (excepto al pulmón) (Figs. 32-36, Tabla III).

8.2.4. Pulmón

Los pulmones de las tortugas marinas son el sitio donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso y son los primeros en recibir la perfusión de oxígeno, además de ser el principal reservorio de este gas, cosa que se atribuye a que las tortugas marinas son organismos que bucean en aguas poco profundas, al igual que el ornitorrinco, las nutrias marinas, los manatíes y los delfines (en Lutcavage y Lutz, 1997). Los pulmones de las tortugas marinas tienen una gran superficie de intercambio gaseoso debido a la gran cantidad de subdivisiones que poseen (en Lutcavage y Lutz, 1997). Por lo anterior se explica por qué los pulmones manifiestan tasas de producción de O_2^- incrementadas (Figs. 32, Tabla III). Los pulmones de las tortugas marinas presentan menor resistencia a la transferencia de gases, es decir, su capacidad de difusión es más grande que la de los demás

reptiles (Lutcavage y Lutz, 1997), por lo que el O_2^- formado pudo haber difundido antes de ejercer algún daño, ya que, se conoce, que este radical puede difundir a una distancia considerable de donde fue formado (Fridovich, 1998). Lo anterior es apoyado por el hecho de que el tejido pulmonar de las tortugas negras presentó los menores niveles de TBARS y de la actividad de las enzimas SOD, CAT y GST (Figs. 33-36, Tabla III), las cuales posiblemente no tenían mucho sustrato sobre el cual actuar.

8.2.5. Riñón

Las principales funciones de los riñones de las tortugas marinas son las de eliminar los productos de desecho y regular la composición electrolítica de la sangre (Lutz, 1997). Estos órganos presentaron bajos niveles de producción de O_2^- (Fig. 32, Tabla III), sin embargo, es posible que estén produciendo otro tipo de EROs. En *Trachemys scripta elegans* se observó una disminución del 50% en su contenido de glutatión total (GSH + GSSG) en la mayoría de los órganos después de una exposición prolongada a anoxia, lo cual sugiere que el glutatión tiene un papel importante en los procesos de detoxificación de los productos acumulados durante la ausencia de oxígeno (xenobióticos, hidoperóxidos lipídicos e hidoperóxidos de nucleótidos), para lo cual, la glutatión S-transferasa (GST) debe estar actuando (Storey, 1996a). Es probable que algo similar ocurra en el tejido renal de las tortugas negras, ya que se encontraron elevados niveles de GST en el riñón de esta especie (<77.6% más que los demás tejidos excepto el hígado), a pesar de que no tiene una producción sobresaliente de O_2^- (Figs. 32 y 36). Por otra parte, en el riñón también se encontraron niveles de catalasa (CAT) muy elevados con respecto a otros tejidos (< 94.2%), excepto el hígado (Fig. 35), lo cual es similar a lo reportado en sapos (*Scaphiopus*

couchii) y en tortugas de agua dulce (*Trachemys scripta elegans*), en los cuales se encontró <96.9% y <79.5% más actividad que en los demás tejidos, respectivamente (Grundy y Storey, 1998; Willmore y Storey, 1997). Esto sugiere que existe una formación elevada de H_2O_2 . Sin embargo, el H_2O_2 se forma a partir del $O_2^{\cdot -}$ por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), cuyas tasas de producción y actividad, respectivamente, no fueron sobresalientes en el riñón (Figs. 32 y 34). Es probable que la CAT pueda estar actuando en otros substratos como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles, actuando así como una peroxidasa (Aebi, 1984; Matés *et al.*, 1999). La elevada actividad de la GST y la CAT en los riñones, además de sus bajos niveles de producción de $O_2^{\cdot -}$ explican que no presente elevados niveles de peroxidación de lípidos.

8.2.6. Tumores

La producción de $O_2^{\cdot -}$ y la actividad de SOD en el tejido tumoral de tortugas verdes no fueron sobresalientes con respecto a otros tejidos, sin embargo, los niveles de TBARS que presentaron fueron significativamente más elevados que el resto de los tejidos ($p=0.05$), lo cual sugiere un mayor daño oxidativo (Figs. 32-36, Tabla III). Esto hace pensar que en los tumores deben estar actuando otro tipo de especies reactivas de oxígeno (EROs) aparte del $O_2^{\cdot -}$, lo cual se sostiene con el hecho de que la actividad de la enzima CAT no es muy elevada como para depurar las cantidades de H_2O_2 que la enzima SOD pudiese estar produciendo (Fig. 35). Por otra parte, la actividad de la GST en tumores quizá no sea la suficiente la GST para detoxificar todos los residuos resultantes de los elevados niveles de TBARS como ciertos productos aldehídicos que pueden estarse acumulando, y al no ser

depurados, pudieran estar actuando directamente sobre el ADN produciendo alteraciones (Gil del Valle *et al.*, 1999).

Autores como Oberley y Spitz (1984) y Huang *et al.* (2000) encontraron una elevada producción de O_2^- y una baja actividad de SOD en células cancerosas en cultivo, lo cual no coincide con lo que en este estudio se encontró. Por otra parte, Halliwell y Gutteridge (1999) mencionan que tumores malignos de animales y células tumorales en cultivo, muestran una baja actividad de la enzima Mn-SOD específicamente, sin embargo, estos resultados no son consistentes para humanos, en los que no se encontraron decrementos muy marcados en la Mn-SOD y otras enzimas antioxidantes en tejido canceroso fresco, incluso, los niveles algunas veces se reportaron como elevados (en Halliwell y Gutteridge 1999). Sin embargo, en este estudio se determinó la SOD total.

Oberley y Spitz (1984) afirman que la actividad de SOD en tejido tumoral siempre es baja en comparación con la actividad del tejido del cual deriva, lo cual no fue posible comprobar debido a que los tumores analizados fueron obtenidos de la epidermis de organismos vivos; no se tomaron muestras de otros tejidos diferentes a los tumores, con el fin de no provocar daños a estas tortugas.

La unión covalente de los compuestos electrofílicos derivados de los carcinógenos a las macromoléculas, especialmente el ADN, ha sido considerado como un paso inicial en la carcinogénesis química, por lo que la enzima antioxidante GST ha sido considerada por varios autores como biomarcador de neoplasias con este origen (Tsuchida y Sato, 1992; Stegeman *et al.*, 1992), durante la carcinogénesis existen cambios en las isoenzimas de la GST. Específicamente, la GST- π se ha visto incrementada en lesiones preneoplásicas y

neoplásicas, su incremento es muy evidente cuando hay metástasis, por ejemplo en tumores de hígado originados de la vejiga urinaria, del estómago y del colon (Tsuchida y Sato, 1992). Por lo que se sugiere buscar la isoforma GST- π en los tejidos de tortugas marinas.

Tanto en los tumores como en la sangre de tortugas verdes con FP no se encontró una actividad sobresaliente de la GST (Figs. 17 y 21, Tablas I y III). Sin embargo, en humanos se ha observado que la actividad de esta enzima incrementa en el cáncer de pulmón, pero disminuye cuando hay cáncer en el hígado y el riñón (Tsuchida y Sato, 1992). Los resultados obtenidos en este estudio pueden deberse a que la expresión de las GST es tejido-específica, además, cada órgano posee una combinación única de isoformas de GST (Tsuchida y Sato, 1992). Los bajos niveles de GST detectados en tejidos de tortuga verde con FP no quieren decir que la isoforma GST- π no esté presente, y se sugiere localizarla específicamente. Por otra parte, Stegeman *et al.* (1992) encontraron que la actividad de GST en mamíferos con neoplasias tiende a elevarse, mientras que en peces (*Catostomus commersoni*) con neoplasias disminuye. Los resultados obtenidos en tortugas marinas son más similares a la respuesta que Stegeman *et al.* (1992) encontraron en peces.

8.3. Análisis de Funciones Discriminantes

El análisis de funciones discriminantes es un método de la estadística multivariada adecuado para analizar sistemas complejos en los que existe un alto grado de interacción entre diversas variables, las cuales son consideradas simultáneamente (Milstein, 1993). El objetivo de realizar este análisis fue el de apreciar la existencia de diferencias en el ymetabolismo oxidativo por tejido, y en caso de haberlas, en qué sentido. Con este análisis

fue posible integrar los resultados de las variables determinadas, y gracias a él es posible apreciar el metabolismo oxidativo como un todo en cada tejido de las tortugas marinas, además de ver cuáles de las variables actúan en mayor o menor grado de acuerdo a la fisiología propia de cada tejido (Fig. 37, Tabla IV).

Las primeras dos raíces obtenidas de este análisis fueron suficientes para separar cuatro grupos de datos, tres de ellos correspondientes a tres de los tejidos analizados (hígado, riñón y tumores), y el cuarto congregando a los otros tres tejidos (músculo pectoral, corazón y pulmón) debido a su metabolismo oxidativo similar (Fig. 37, Tabla IV). La primer raíz separó al hígado del grupo del músculo, corazón y pulmón, en esta raíz tuvieron más peso la producción de O_2^- y la CAT, las cuales presentaron sus valores más elevados en el hígado, mientras que en el otro grupo se mostraron sus valores más bajos, lo cual se puede tomar como una característica particular de cada uno de estos grupos en términos de metabolismo oxidativo (Fig. 37, Tabla IV). Por otra parte, en la raíz 2 la SOD y los niveles de TBARS separaron al riñón de los tumores, presentando los valores más bajos y más altos, respectivamente, lo cual también se puede tomar como característica propia de cada grupo (Fig. 37, Tabla IV). Es razonable que el músculo pectoral y el corazón tuvieran características en común, ya que, en general, se trata de músculos. El pulmón en tortugas marinas presenta músculo liso íntimamente asociado a una matriz de fibras elásticas en todos los conductos, además de tejido conectivo fibroso y una envoltura mioelástica cerca de los alveolos (Lutcavatge y Lutz, 1997), lo cual puede explicar en parte el hecho de que estuviera agrupado junto con el corazón y el músculo.

8.4. Comparación con Otros Reptiles

Existen únicamente dos estudios de estrés oxidativo en reptiles con los cuales se compararon los resultados obtenidos, uno de ellos fue llevado a cabo por Hermes-Lima y Storey, (1993) en la serpiente liga (*Thamnophis sirtalis parietalis*), y el otro fue realizado por Willmore y Storey (1997a,b), en tortugas de agua dulce (*Trachemys scripta elegans*). Cabe mencionar que en estas comparaciones no se tomaron en cuenta los valores del pulmón de *Chelonia mydas agassizii*. debido a que no tienen punto de comparación. *C. m. agassizii* y *T. s. parietalis* presentaron patrones similares con respecto a que todas las enzimas antioxidantes presentaron una mayor actividad en el hígado con respecto al músculo; en el caso de la SOD con un 31.3% y 59.03% más actividad en los hígados de *C. m. agassizii* y en *T. s. parietalis*, respectivamente, un 92.9% y 68.1% más actividad de CAT y un 79.6% y 90.8% de GST (Tabla VI). Sin embargo, los niveles que se presentaron en *C. m. agassizii* son más elevados que los de *T. s. parietalis*, lo cual puede deberse a que, a pesar de ser reptiles pertenecen a un diferente orden (Testudines y Squamata) o a la aplicación de las técnicas. Desafortunadamente el estudio realizado en *T. s. parietalis* solamente se remite al hígado y el músculo, por lo que no fue posible hacer comparaciones con los demás órganos.

Por otra parte, *C. m. agassizii* resultó tener la mayor actividad de todas las enzimas antioxidantes en el hígado; <37.2% con respecto a la SOD, <92.9% con respecto a la CAT, y <90.1% con respecto a la GST, no obstante, *T. s. elegans* presentó la mayor actividad de SOD y GST en el riñón, aunque las diferencias que presentó en este órgano con respecto al hígado fueron mínimas para la SOD (1.6%), pero fueron muy grandes para la GST (48.8%), por otra parte, la actividad de la CAT tanto el hígado como el riñón presentaron la

misma actividad. El riñón es el tejido que tiene más actividad después que el hígado en *C. m. agassizii* (a excepción de la SOD); 18.5% menos actividad de CAT que el hígado y 55.7% menos actividad de GST que el hígado. En ambas especies se encontraron similitudes con respecto al tejido muscular y cardíaco: en *C. m. agassizii* los valores concernientes a TBARS y SOD fueron muy similares en el músculo y en el corazón (0.9% y 8.5% de diferencia, respectivamente), al igual que en *T. s. elegans* lo fueron los niveles de SOD en el corazón y el músculo blanco (13.8% de diferencia), y la actividad de CAT en el corazón y los músculos rojo y blanco (1.5%, y 13.5% de diferencia, respectivamente). Con respecto a la actividad de GST, estos se reportan como iguales en el estudio de *T. s. elegans*.

A pesar de que se trata de organismos pertenecientes al mismo orden (Testudines), es posible observar que los valores de TBARS que presenta *C. m. agassizii* son mayores que los que presenta *T. s. elegans*, pero los rangos de actividad de las enzimas antioxidantes son menores en *C. m. agassizii*, estas diferencias pueden deberse a las técnicas utilizadas, a diferencias por el medio en que habitan ambos organismos, a su edad, a su tamaño, a su alimentación, etc.

8.5. Tortugas Marinas con y sin FP

8.5.1. Sangre

Los resultados obtenidos en la sangre son similares para todas las enzimas analizadas, en las que se encontró una actividad significativamente mayor para las muestras de tortugas negras de Baja California con respecto a las tortugas verdes de Hawaii (Figs.

38-40, Tabla III), tanto las sanas (control geográfico) como las enfermas (con FP). Por otra parte, las tortugas verdes no presentaron diferencias entre sí (Figs. 38-40, Tabla III).

Existe el riesgo potencial de que las diferencias encontradas en el sistema antioxidante de las tortugas negras con respecto a las verdes, estén dadas debido a que las muestras provenientes de Hawaii fueron procesadas en un laboratorio diferente que las de Baja California (en Ohio University y en el CIBNOR, respectivamente). Por otra parte del estatus taxonómico de estos organismos más que a la presencia o ausencia de FP. Esto nos dice que el riesgo de desarrollar fibropapilomas puede estar íntimamente relacionado con la integridad del sistema antioxidante de los organismos, ya que la actividad de las enzimas antioxidantes es más elevada en las tortugas negras y en ellas no se han encontrado tumores; en cambio, es posible que el estado del sistema antioxidante de las tortugas de Hawaii contribuya a incrementar su susceptibilidad para desarrollar FP. El sistema antioxidante es el encargado de regular las funciones de las EROs y de contrarrestar los daños que éstas ocasionen. Las EROs participan de manera importante en el daño producido por infecciones virales y en la progresión del cáncer (Matés *et al.*, 1999). Por lo que la expresión de las enzimas antioxidantes, juega un papel esencial en el ciclo celular y en el balance de la vida al actuar contrarrestando enfermedades y promoviendo la inmunidad (Matés *et al.*, 1999; Gil del Valle *et al.*, 1999).

Otra manera en que se puede relacionar el estrés oxidativo con la FP es la inmunosupresión; se sabe que las células del sistema inmune tienen la capacidad de generar EROs en respuesta al ataque de microorganismos patógenos, el sistema antioxidante mantiene a las células del sistema inmune en un ambiente reducido, protegiéndolas del estrés oxidativo al que sus propias funciones pueden conllevar (De la Fuente y Víctor,

2000). Por lo que deficiencias en antioxidantes pueden desencadenar el funcionamiento inadecuado del sistema inmune (De la Fuente y Víctor, 2000), y se conoce que las tortugas marinas con un sistema inmune deprimido, pueden ser más vulnerables a parásitos y a enfermedades como la FP (Milton y Lutz, 2003).

Es complicado tratar de explicar la razón por la cual el sistema antioxidante en los organismos de las Islas de Hawaii se encuentra comparativamente decaído con respecto al de las tortugas de Baja California. Por una parte puede tratarse de la fisiología normal de éstos organismos, o a que presentan diferencias por el simple hecho de estar ubicados en regiones geográficas diferentes con características ambientales diferentes y no por la presencia de FP. Es posible pensar que algún factor o algunos factores estresantes estén actuando sobre la población de tortugas de Hawaii, más no en la de Baja California.

Entre los agentes estresores que pudieran estar alterando a las tortugas marinas se encuentran agentes naturales y antropogénicos, incluyendo factores ambientales (salinidad, contaminación, temperatura), factores fisiológicos (hipoxia, desbalance ácido-básico, estado nutricional), factores físicos (traumas), y factores biológicos (blooms tóxicos, parásitos, enfermedades) (Milton y Lutz, 2003). Sin embargo, se conoce que la temperatura de la superficie del océano en Hawaii y en Baja California son similares (aproximadamente 25°C) (Flament, 1996; Maeda-Martínez *et al.*, 1993), al igual que la salinidad (aproximadamente 35 ppt) (Flament, 1996; López-Martínez *et al.*, 2000), por otra parte, se sabe que los componentes principales de la dieta de las tortugas verdes de Hawaii son *Codium edule*, *Codium arabicum*, *Codium phasmaticum* y *Ulva fasciata* (U.S. Fish and Wildlife Service, 1997), a diferencia de las tortugas negras (Bahía Magdalena), en las que *Gracilaria pacifica*, *Gracilariopsis lemaneiformis* e *Hypea johnstonii*, además del pasto

marino *Phyllospadix torreyi*, son los elementos más representativos de la dieta, aunque se ha visto que hay una preferencia por *Codium amlivesiculatum* (López-Mendilaharsu, 2002). Por otra parte, se sabe que las principales fuentes de EROs para los organismos marinos son la radiación UV y la exposición a contaminantes, ya que al encontrarse inmersos en el ambiente acuático, quedan totalmente expuestos a dichos factores, los cuales pueden inducir los procesos de carcinogénesis (por ejemplo en peces) (Winston *et al.*, 1991; Livingstone, 2001; en Zenteno-Savín, 2002); en ambas poblaciones de tortugas marinas se ha evaluado la presencia de contaminantes, (organoclorados en el caso de Baja California y organoclorados, organofosforados y metales traza en el caso de Hawaii), pero en ninguna de las poblaciones se han encontrado niveles alarmantes (Aguirre *et al.*, 1994a; Gardner *et al.*, 2003), además, en el estudio realizado por Aguirre *et al.* (1994a) no se encontró ninguna correlación entre dichos contaminantes y la presencia de FP en tortugas de Hawaii. Por otra parte, se sabe que la FP ocurre más frecuentemente en tortugas verdes capturadas cerca de regiones densamente habitadas e industrializadas que en animales de lugares donde la población se encuentra esparcida (Milton y Lutz, 2003), lo cual es importante, ya que Baja California en comparación de Hawaii es una zona débilmente industrializada y es considerada como un ambiente pristino.

Se sugiere evaluar los niveles de corticosterona de organismos de ambas poblaciones y hacer comparaciones, ya que la corticosterona (catecolaminas) se produce en respuesta a cierto rango de agentes estresantes en tortugas (Milton y Lutz, 2003), y si efectivamente las tortugas de Hawaii están más estresadas, los niveles de corticosterona deberán ser más elevados en ellas. Cabe mencionar que el término “estrés” se refiere a los cambios fisiológicos que sufren los organismos al intentar adaptarse a un agente que se

encuentre actuando sobre ellos (Milton y Lutz, 2003). Dicho vocablo es diferente al término de “estrés oxidativo”, el cual se define como el desequilibrio entre la producción de EROs y antioxidantes, ya sea por un exceso en la producción de radicales y/o un debilitamiento de los sistemas antioxidantes (Gil del Valle *et al.*, 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999). Por otra parte, se sabe que ciertos estresores químicos ejercen su toxicidad por medio de EROs, es decir, generando un estrés oxidativo (Martínez-Cayuela, 1998).

Otro punto de vista es que la baja actividad de las enzimas antioxidantes en la sangre de las tortugas verdes, más que una causa, puede ser una consecuencia de la FP. Los bajos niveles de antioxidantes en las tortugas de sanas de Hawaii pueden deberse a que se encuentran en una zona donde esta enfermedad se presenta y está latente, por lo que ellas pueden manifestarla de un momento a otro. El hecho de que no presenten tumores externos no significa que no los tengan internamente, o bien, que ya se encuentren contagiadas y estén en proceso de desarrollar los fibropapilomas.

Por otra parte es importante el hecho de haber evaluado la sangre porque se espera que la actividad encontrada en ella sea un reflejo de lo que está sucediendo en el resto del organismo, y que finalmente, pueda ser empleada para realizar los monitoreos de enzimas antioxidantes, ya que es un método que puede llevarse a cabo en organismos vivos y es ideal para aplicarse en especies amenazadas, como las tortugas marinas.

9. CONCLUSIONES

- El metabolismo oxidativo basal de las tortugas negras y verdes presentó algunas diferencias en cuanto a grupos de edad, estaciones del año y localidades específicas de muestreo.
- No se encontraron diferencias con respecto al sexo de las tortugas negras ni en cuanto al grado de severidad de la fibropapilomatosis de las tortugas verdes.
- No se encontró ninguna correlación entre las variables del metabolismo oxidativo evaluadas con respecto a la edad de las tortugas negras y el FPS de las tortugas verdes.
- El metabolismo oxidativo de las tortugas negras resultó ser similar en los tejidos muscular, cardíaco y pulmonar. Mientras que el hígado y el riñón (de tortugas negras) y los tumores (de tortugas verdes) resultaron tener un patrón de metabolismo oxidativo propio y diferente al de los demás tejidos.
- *Chelonia mydas agassizii* presenta en sus tejidos un patrón similar de TBARS, SOD, CAT y GST con respecto a otros reptiles.
- En la sangre de tortugas verdes de Hawaii se observa una menor actividad de las enzimas SOD, CAT y GST con respecto a las tortugas negras de Baja California.
- El metabolismo oxidativo aparentemente no es una herramienta recomendable para monitorear la presencia de FP en las poblaciones de tortugas verdes, sin embargo, quizá sea un buen indicador de diferentes condiciones ambientales.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

El presente estudio surgió a partir de la pregunta: ¿por qué la población de tortugas de Baja California no presentan FP y otras poblaciones de tortugas si lo presentan?. Al tratar de buscar alguna explicación y conocer que los radicales libres y antioxidantes están relacionados con el crecimiento tumoral, entonces vino la siguiente pregunta: ¿de qué manera estará relacionado el metabolismo oxidativo con la FP?

De acuerdo a lo anterior, este estudio ha tenido dos utilidades; la primera es la de conocer más la fisiología de las tortugas de Baja California, de las cuales, existen escasos estudios al respecto, con esto quedan sentadas las bases de su metabolismo oxidativo “normal” en tejidos y sangre, lo cual puede utilizarse como referencia para la realización de cualquier otro estudio, además, este tipo de estudios no se había realizado antes en ninguna especie de tortugas marinas. La segunda utilidad es la de aclarar un poco la fisiología de la FP, enfermedad que necesita ser estudiada desde varios puntos de vista para llegar al total entendimiento de sus causas y sus consecuencias, así como de sus mecanismos de acción y poder contrarrestarla en un futuro. Por otra parte, este estudio podría ayudar al establecimiento de las bases científicas para la realización de una posible terapia con antioxidantes.

En base a los resultados obtenidos, algunos de los estudios que se sugiere hacer como complemento a este trabajo son los siguientes:

- En primer lugar se recomienda enviar las muestras procesadas en el CIBNOR a Ohio University y volverlas a procesar, esto con el fin de descartar la existencia de diferencias entre las muestras analizadas en los distintos laboratorios.

- Hacer estudios de bioquímica sanguínea e inmunología en las tortugas de Baja California para tener un panorama general de su salud con respecto a otras poblaciones (como la de Hawaii).
- Sería de mucha utilidad evaluar antioxidantes como las vitaminas E y C, y los carotenoides, para apreciar en qué manera el alimento que consumen las tortugas tiene que ver con su sistema de defensa antioxidante.
- Cuantificar los niveles de corticosterona en las tortugas de Baja California y las de Hawaii para apreciar si en realidad los organismos de esta última población se encuentran más estresados.
- Evaluar otros elementos del metabolismo oxidativo que pudieran servir como biomarcadores de FP. Por ejemplo, la cuantificación por separado de la actividad de las enzimas Mn-SOD y la CuZn-SOD, la detección específica de la GST- π y la evaluación del daño a ADN por EROs.
- Para complementar el esquema de metabolismo oxidativo de las tortugas negras y verdes, se sugiere medir la tasa GSH/GSSG, así como las enzimas GR y GPx.

11. LITERATURA CITADA

- Aebi H. 1984. Catalase *In Vitro*. En: Packer L. (ed). Methods in Enzymology Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press Inc., Orlando, Florida. 121-126.
- Aguirre A.A. y G.H. Balazs. 2000. Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. Comparative Haematology International 10:132-137.
- Aguirre. A. A., G.H. Balazs, B. Zimmerman y F.D. Galey. 1994a. Organic contaminants and trace metals in the tissue of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. Marine Pollution Bulletin 28 (2): 109-114.
- Aguirre. A. A., G.H. Balazs, B. Zimmerman y T.R. Spraker. 1994b. Evaluation of hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. Journal of Wildlife Diseases 30:8-15.
- Aguirre A.A., G.H. Balazs, T.R. Spraker y T.S. Gross. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green sea turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. Physiological Zoology 68 (5): 831-854.
- Aguirre A.A., T.M. O'Hara, T.R. Spraker y D.A. Jessup. 2002. Monitoring the health and conservation of marine mammals and sea turtles and their ecosystems. En: Aguirre A.A., R.S. Ostfeld, G.M. Tabor, C.A. House y M.C. Pearl (eds.). Conservation medicine: ecological health in practice. Oxford University Press, New York. 79-84.
- Aguirre A.A., T.R. Spraker, G.H. Balazs y B. Zimmerman. 1998. Spirochidiasis and fibropapillomatosis in green sea turtles from de hawaiian islands. Journal or Wildlife Diseases 34 (1): 91-98.
- Aguirre A.A., T.R. Spraker, A. Chaves, L. du Toit, W. Eure y G.H. Balazs. 1999. Pathology of fibropapillomatosis in olive ridleys turtles *Lepidochelys olivacea* nesting in Costa Rica. Journal of Aquatic Animal Health 11: 283-289.
- Ahmad J., B.T. Ashok y R. Ali. 1998. Detection of oxidative DNA damage by monoclonal antibody: role of lysyl residues in antigen binding. Immunology Letters 62: 87-92.
- Ahmad S. y R.S. Pardini. 1988. Evidence for the presence of glutathione peroxidase activity towards an organic hydroperoxide in larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Insect Biochemistry 18:861-866.

- Alberts B., D. Bay, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson. 1983. Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. 1a. Ed., New York 1256 pp.
- Alvarado J. y A. Figueroa. 1990. The ecological recovery of sea turtles of Michoacan, Mexico. Special attention: the black turtle *Chelonia agassizii*. Final report 1989-1990, U.S. Fish and Wildlife Service, Albuquerque, Nuevo Mexico. 97 pp.
- Babu T.S., X-D. Huang y B.M. Greenberg. Reactive oxygen species mediated toxicity of environmental contaminants. SETAC Globe 3 (3): 26-28.
- Balazs, G.H. 1991. Current status of fibropapillomatosis in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. En: Balazs G. H. y S. Pooley (eds.). Research plan for marine turtle fibropapilloma. NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-156. U.S. U.S. Department of Commerce., Honolulu, Hawaii 47-57.
- Balazs, G.H. 1995a. Growth rates of immature green turtles in the Hawaiian Archipelago. En: Bjorndal K.A. (ed). Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institute, Washington. 117-125.
- Balazs, G.H. 1995b. Status of sea turtles in the central Pacific Ocean. En: Bjorndal K.A. (ed). Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institute, Washington. 243-252.
- Beckman K.B. y Ames B.N. 1997. Oxidative decay of DNA. Journal of Biological Chemistry 272(32):19633-19636.
- Bird R.P. y H.H. Draper. 1984. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. En: Packer L. (ed). Methods in Enzymology Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Orlando, Florida. 299-304.
- Bjorndal K.A. 1995. Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington. 615 pp.
- Bjorndal K.A. 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (eds). The biology of sea turtles Vol.1. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida. 199-232.
- Bolten A.B. 2000. Técnicas para la medición de tortugas marinas. En: Eckert K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas (traducción al español). Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4: 137-142.

- Bolten A.B. 2003. Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages. En: Lutz P.L., J.A. Musick y J. Wyneken (eds). The biology of sea turtles Vol. 2. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 243-257.
- Bolten A.B. y K.A. Bjorndal. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size specific and sex-specific relationships. Journal of Wildlife Diseases 28:407-413 .
- Boulon R.H. 2000. Reducción de las amenazas a los huevos y las crías: protección *in situ*. En: Eckert K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas (traducción al español). Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4. 192-198.
- Bowen B.W. y S.A. Karl. 1997. Population genetics, phylogeography and molecular evolution. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (eds). The biology of sea turtles Vol.1. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida. 29-50.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Brown D.R., J.K. Lackovich y P.A. Klein. 1999. Further evidence for the absence of papillomaviruses from sea turtle fibropapillomas. The Veterinary Record. 145: 616-617.
- Cancino B.L., Leiva G.A., Garrido G., Cossío A.M. y Prieto G.E. 2001. VIMANG: Los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. Revista Cubana de Investigación Biomédica 20 (1):48-53.
- Carlberg I. y B. Mannervik. 1985. Glutathione reductase. En: Meister A., S.P. Colowik y N. Kaplan (eds.). Methods in Enzymology Vol. 113: Glutamate, glutamine, glutathione, and related compounds. Academic Press Inc., Orlando, Florida. 484-490.
- Casey R.N., S.L. Quackenbush, T.M. Work, G.H. Balazs, P.R. Bowser y J.W. Casey. 1997. Evidence for retrovirus infections in green turtles *Chelonia mydas* from the Hawaiian Islands. Diseases of Aquatic Organisms 31:1-7.
- Çelik İ., Y. Tülüçe, y N. Özok. 2002. Effects of indolacetic acid and kinetin on lipid peroxidation levels in various rat tissues. Turkish Journal of Biology 26:193-196.
- Clayton H.E. 2002. Producción y efecto del radical superóxido en tejidos de foca anillada (*Phoca hispida*) y de cerdo común (*Sus scrofa*). Tesis de maestría. CIBNOR, La Paz, B.C.S. 104 pp.

- Cliffton K., D.O. Cornejo, y R.S. Felger. 1995. Sea turtles of the Pacific coast of México. En: Bjorndal K.A. (ed.). Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. 199-210.
- Curtis H. y N.S. Barnes. 1993. Biología. 5a. Ed. Edit. Médica Panamericana. México D.F., 1199 pp.
- Dailey M.D. y R. Morris 1995. Relationship of parasites (Trematoda: Spirochrchidae) and their eggs to the occurrence of fibropapillomas in the green turtle (*Chelonia mydas*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52 (Suplement 1):84-9.
- D'Amato A.F. y M. Moraes-Neto. 2000. First documentation of fibropapillomas verified by histopathology in *Eretmochelys imbricata*. Marine Turtle Newsletter 89: 12-13.
- De la Fuente M. y V.M. Víctor. 2000. Anti-oxidants as modulators of immune function. Immunology and Cell Biology. 78: 49-54.
- Diario Oficial de la Federación. 2002. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, 6 de marzo de 2002.
- Downs C.A., J.E. Fauth y C.M. Woodley. 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. Marine Biotechnology 3: 380-397.
- Drossos G., A. Lazou, P. Panagopoulos y S. Westaby. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. Annals of Thoracic Surgery 59: 169-172.
- Eckert K.L. 1995. Anthropogenic threats to sea turtles. En: Bjorndal K.A. (ed). Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institute, Washington. 611-612.
- Fang Y.Z., S. Yang y G. Wu. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 18: 872-879.
- Figuroa A. y J. Alvarado. 1990. Morphometric comparison of the *Chelonia* populations of Michoacan, Mexico and Tortuguero, Costa Rica. En: Richardson T.H., J.I. Richardson y M. Donnelly (eds.). Proceedings of the tenth annual symposium on sea turtle biology and conservation. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-278 179-178.
- Flohé L. y W.A. Günzler. 1984. Assays of glutathione peroxidase. En: Packer L. (ed). Methods in Enzymology Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Orlando, Florida. 114-120.

- Fraizer J. 2003. Prehistoric and ancient historic interaction between humans and marine sea turtles. En: Lutz P.L., J.A. Musick y J. Wyneken (eds). The biology of sea turtles vol. 2. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 1-38.
- Frenzilli G., M. Nigro, V. Scarcelli, S. Gorbi, F. Regoli. 2001. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*: a field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. Aquatic Toxicology. 53: 19-32.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. Journal of Experimental Biology. 201: 1203-1209.
- Gardner S.C., M.D. Pier, R. Wesselman y J.A. Juárez. 2003. Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. Marine Pollution Bulletin. 46: 1082-1089.
- Gardner S.C. y W.J. Nichols. 2001. Assesment of sea turtle mortality rates in the Bahía Magdalena Region, Baja California Sur, México. Chelonian Conservation and Biology. 4 (1): 197-199.
- Garret A.L., C. Feliciano y A.L. Tyner. 2003. A new method for determining the status of p53 in tumor cell lines of different origin. Oncology Research. 13 (6-10): 405-408.
- George R.H. 1997. Health problems and diseases of sea turtles. En: Lutz P.L.y J.A. Musick (eds). The biology of sea turtles Vol.1. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida. 363-385.
- Gil-del Valle L., G. Martínez-Sánchez, I. González-Blanco, y L.J. Pérez-Avila. 1999. Estrés oxidativo: mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmuno deficiencia humana. Bioquímica. 24 (4-97): 85-93.
- Grundy W.H., y K.B. Storey. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. Journal of Comparative Physiology B 169: 132-142.
- Habig W.H., M.J. Pabst, y W.B. Jakoby. 1974. Glutathione S-Transferases. Journal of Biological Chemistry 249(22): 7130-7139.
- Habig W.H. y W.B. Jakoby. 1981. Glutathione S-transferases (Rat and Human). En: Jakoby W.B. (ed.). Methods in enzimology Vol. 77: Detoxication and drug metabolism; conjugation and related systems. Academic Press, Orlando, Florida.218-234.
- Halliwell B. y J.M.C. Gutteridge. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. 3a. Ed., Oxford, Inglaterra. 936 pp.
- Harshbarger J.C.1991. Sea turtle fibropapilloma cases in the registry of tumors in lower animals. En: Balazs G.H. y Pooley S.G. (eds.). Research plan for marine turtle

- fibropapilloma. U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-156. 63-70.
- Herbst L.H. 1994. Fibropapillomatosis in marine turtles. *Annual Review of Fish Diseases* 4:389-425.
- Herbst L.H. y E.R. Jacobson. 1995. Diseases of Marine Turtles. En: Bjorndal K.A. (ed). *Biology and conservation of sea turtles*. Smithsonian Institute, Washington. 593-596.
- Herbst L.H., E.R. Jacobson, R. Moretti, T. Brown, J.P. Sundberg y P.A. Klein. 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Diseases of Aquatic Organisms* 22:1-112.
- Herbst L.H. y P.A. Klein. 1995. Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors. *Environmental Health Perspectives* 130:27-30.
- Hermes-Lima M. y Storey K.B. 1993. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *American Journal of Physiology* 265: R646-R652.
- Hermes-Lima M. y Storey K.B. 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipiens*. *American Journal of Physiology* 271: R918-R925.
- Hermes-Lima M., Stortey J.M. y Storey K.B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 120: 437-448.
- Huang P., L. Feng, E.A. Oldham, M.J. Keating y W. Plunkett. 2000. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature* 407: 390-395.
- Huerta P., H. Pineda, A.A. Aguirre, T.R. Spraker, L. Sarti y A. Barragán. 2002. First confirmed case of fibropapilloma in a leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Proceedings of the 20th Annual Symposium of Sea Turtle Biology and Conservation*. U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-477, Miami, Florida. 193.
- Hussain S.P., K. Raja., P:A. Amstad, M. Sawyer, L.J. Trudel, F.N. Wogan, L.J. Hofseth, P.G. Shields, T.R. Billiar, C. Trautwein, T. Oler, P.R. Galle, D.H. Phillips, R. Markin, A. J. Marrogi, y C.C. Harris. 2000. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (23): 12770-12775.

- Jacobson E.R., C. Buergelt, B. Williams y R.K. Harris. 1991. Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle, *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 12:1-6.
- Jhonson P. 2002. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hipertensión. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 133: 493-505.
- Joanisse D.R. y K.B. Storey. 1996. Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects. *Journal of Experimental Biology*. 199: 1483-1491.
- Kamezaki N. Y M. Matsui. 1995. Geographic variation in skull morphology of the green turtle, *Chelonia mydas*., with a taxonomic discussion. *Journal of Herpetology* 29 (1): 51-60.
- Karl S.A. y B.W. Bowen. 1999. Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*. 13 (5): 990-999.
- Kawamura N. 2000. Catalase. En: Taniguchi N. y M.C.J. Gutteridge (eds.). *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University Press, Oxford, U.K. 77-78.
- Klungland A., I. Rosewell., S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl y D.E. Barnes. 1999. Acumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(23): 13300-13305.
- Lackovich J.K., D.R. Brown, B.L. Homer, R.L. Garber, D.R. Mader, R.H. Moretti, A.D. Patterson, L.H. Herbst, J. Oros, E.R. Jacobson, S.S. Curry y P.A. Klein. 1999. Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. *Diseases of Aquatic Organisms* 37: 89-97.
- Landsberg J.H., G.H. Balazs, K.A. Steidinger, D.G. Baden, T.M. Work y D.J. Russell. 1999. The potential role of natural tumor promoters in marine turtle fibropapillomatosis. *Journal of Aquatic Animal Health*. 11:199-210.
- Lewin B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press, NY. 990 pp.
- Livingstone D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 42 (8): 656-666.
- López-Martínez J., M.O. Nevarez-Martínez, A. Leyva-Contreras y O. Sánchez. 2000. Análisis de tres variables oceanográficas en la región de Guaymas, Sonora, México.

En: Lluch-Belda D., U. Elorduy-Garay, S.E. Lluch-Cota y G. Ponce-Díaz (eds.). BAC, centros de actividad biológica del Pacífico mexicano. CIBNOR, CICIMAR, UABCS, Baja California Sur, México. 229-245.

- López-Mendilaharsu M.M. 2002. Ecología alimenticia de *Chelonia mydas agassizii* en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. Tesis de maestría. CIBNOR, La Paz, B.C.S. 89 pp.
- Lotem J., M. Peled-Kamar, Y. Groner y L. Sachs. 1996. Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93: 9166-9171.
- Lu Y., A.A. Aguirre, T.M. Work, G.H. Balazs, V.R. Nerurkar y R. Yanagihara. 2000. Identification of a small naked virus associated with green sea turtle fibropapilloma. *Journal of Virological Methods* 86: 25-33.
- Lu Y., V.R. Nerurkar, A.A. Aguirre, T.M. Work, G.H. Balazs, y R. Yanagihara. 1999. Establishment and characterization of 13 cell lines from a green turtle (*Chelonia mydas*) with fibropapillomas. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 35: 389-393.
- Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A. y Hermes-Lima M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology* 280: R100-R107.
- Lutcavage M.E. y P.L. Lutz. 1997. Diving physiology. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (eds). *The biology of sea turtles Vol.1*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. 277-296.
- Lutcavage M.E., P. Plotkin, B. Witherington y P.L. Lutz. 1997. Human impacts on sea turtle survival. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (eds). *The biology of sea turtles Vol.1*. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida. 387-409.
- Lutz P.L. 1997. Salt, water, and pH balance in the sea turtle. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (eds). *The biology of sea turtles Vol.1*. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida. 343-361.
- Maeda-Martínez A.N., T. Reynoso-Granados, F. Solís-Marín, A. Lejía-Tristán, D. Aurióles-Gamboa, C. Salinas-Savala, D. Lluch-Cota y P. Ormat-Castro. 1993. A model to explain the formation of catarina scallop *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835), beds in Magdalena Bay, México. *Aquaculture and Fisheries Managements*, 24: 323-340.
- Mantovani G., A. Maccio, C. Madeddu, L. Mura, G. Gramignano, M.R. Lusso, C. Mulas, M.C. Mudu, V. Murgia, P. Camboni, E. Massa, L. Ferreli, P. Contu, A. Rinaldi, E. Sanjust, D. Atzei y B. Elsner. 2002. Quantitative evaluation of oxidative stress,

chronic inflammatory indices and leptin in cancer patients: correlation with stage and performance status. *International Journal of Cancer* 98:84-91.

- Markert M., P.C. Andrews y B.M. Babior. 1984. Measurement of O_2^- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. En: Packer L. (ed). *Methods in Enzymology* Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Orlando, Florida. 358-365.
- Márquez M.R. 1990. FAO species catalogue. Vol 11: sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis. No. 125. Roma, FAO. 81 pp.
- Márquez R. 2002. Las tortugas marinas y nuestro tiempo. Fondo de cultura económica. 3a. Ed. 198 pp.
- Márquez-Millán R. y A.Villanueva. 1988. Investigaciones sobre las tortugas marinas del Golfo y Caribe mexicanos. *Los Recursos Pesqueros del País*. 313-328.
- Martínez-Cayuela M. 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 39 (1): 5-18.
- Mates J.M., Pérez-Gómez C. y Núñez de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32 (8): 595-603.
- McCord J.M. e I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (22): 6049-6055.
- Merino R., Rodríguez-Estrella R., Rivera L., Abad E., Rivera J. y Jiménez B. 2002. Preliminary evaluation of organochlorine contaminants (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) in birds from Baja California, Mexico. *Organohalogen Compounds*. 59: 29-32.
- Milstein A. 1993. Factor and canonical correlation analyses: basic concepts, data requirements and recommended procedures. En: Prein M., G. Hulata y D. Pauly (eds.). *Multivariate methods in aquaculture research: case studies of tilapias in experimental and comercial systems*. ICLARM Stad Rev 20: 24-31.
- Milton S.L. y P.L. Lutz. 2003. Physiological and genetic responses to environmental stress. En: Lutz P.L., J.A. Musick y J. Wyneken (eds.). *The biology of sea turtles* Vol. 2. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 163-197.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7 (9): 405-410.

- Mortimer J.A. 1995. Feeding ecology of sea turtles. En: Bjorndal K.A. Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. 103-109.
- Nakamura K. 1980. Carotenoids in serum of Pacific green sea turtle, *Chelonia mydas*. Bull. Japanese Society of Scientific Fisheries. 46 (7): 909.
- National Marine Fisheries Service and U.S. Fish and Wildlife Service. 1998. Recovery plan for U.S. Pacific populations of East Pacific Green Turtle (*Chelonia mydas*). National Marine Fisheries Service, Silver Spring, Maryland. 50pp.
- Nieto-Garibay A. 1999. Características generales del noroeste de México. En: Álvarez-Castañeda S.T. y J.L. Patton (eds.). Mamíferos del noroeste de México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S. 13-28.
- Norton, T.M., E.R. Jacobson y J.P. Sundberg. 1990. Cutaneous fibropapillomas and renal myxofibroma in green sea turtle, *Chelonia mydas*. Journal of Wildlife Diseases 20:265-270.
- Oberley L.W. y D.R. Spitz. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. En: Packer L. (ed). Methods in Enzymology Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press Inc., Orlando, Florida. 457-464.
- Ogren L. y C. McVea Jr. 1995. Apparent hibernation by sea turtles in North American waters. En: Bjorndal K.A. (ed). Biology and conservation of sea turtles. Smithsonian Institute, Washington. 127-132.
- Ohkawa H., N. Ohishi and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 95: 331-358.
- Owens D.W. 2000. Ciclos reproductivos y endocrinología. En: Eckert K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas (traducción al español). Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4. 137-142.
- Owens, D.W. y G.J. Ruíz. 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. Herpetologica. 36:17-20.
- Paoletti F., D. Aldinucci, A. Mocali, y A. Caparrini. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts. Analytical Biochemistry 154: 536-541.
- Pedrajas J.R., J. Peinado y J. López-Barea. 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. Chemico-Biological Interactions. 98: 267-282.

- Persky A. M., P. S. Green, L. Stublely, C. O. Howell, L. Zaulyanov, G. A. Brzaeau and J. W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 223: 59-66.
- Pippenger C.E., R.W. Browne y D. Armstrong. 1998. Regulatory antioxidant enzymes. En: Armstrong D. (ed.). *Methods in molecular biology* Vol. 108: free radical and antioxidant protocols. Humana Press Inc., Totowa, N.J. 299-313.
- Plotkin P. 2003. Adult migrations and habitat use. En: Lutz P.L., J.A. Musick y J. Wyneken (eds). *The biology of sea turtles* Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida. 225-242.
- Power A. y D. Sheehan. 1996. Seasonal variation in the antioxidant defense systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 114 (2): 99-103.
- Pritchard P.C.H. 1999. Status of the black turtle. *Conservation Biology*. 13 (5): 1000-1003.
- Pritchard P.C.H. 1997. Evolution, phylogeny, and current status. En: : Lutz P.L.y J.A. Musick (ed). *The biology of sea turtles* Vol.1. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida. 1-28.
- Pritchard P.C.H. y J.A. Mortimer. 2000. Taxonomía e identificación de especies. En: Eckert K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds). *Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas (traducción al español)*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4. 22-41.
- Pritchard P.C.H. y P. Trebbau. 1984. *The turtles of Venezuela*. Society for Study of Amphibians and Reptiles, Oxford, Ohio, 403 pp.
- Regoli F. y G.W. Winston. 1999. Quantification of total oxidant scavenging capacity (TOSC) of antioxidants for peroxyxynitrite, peroxy radicals and hydroxyl radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 156: 96-105.
- Rossmann T.G. y E.I. Goncharova. 1998. Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein. *Mutation Research*. 402: 103-110.
- Romer A.S. y T.S. Parsons. 1978. *Anatomía comparada*. 5a. Ed. Nueva Editorial Interamericana. México D.F. 428 pp.
- Sastre J., F.V. Pallardó y J. Viña. 2003. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology & Medicine*. 35(1): 1-8.

- Schmidt-Nielsen K. 1997. Animal physiology: adaptation and environment. 5a. Ed. Cambridge University Press, New York 607 pp.
- Shen H-M. y C-N Ong. 2000. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology & Medicine*. 28 (4): 529-536.
- Seminoff, J.A., A. Resendiz y W.J. Nichols. 2002. Diet of the East Pacific green turtle, *Chelonia mydas*, in the central Gulf of California, México. *Journal of Herpetology* 36:447-453.
- Simontacchi M., A. Galatro y S. Puntarulo. 2000. El estrés oxidativo en las plantas. *Ciencia Hoy*. 10:60.
- Slater T.F. 1984. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. En: Packer L. (ed). *Methods in Enzymology Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems*. Academic Press Inc., Orlando, Florida. 283-293.
- Smith G.M. y C.W. Coates. 1939. The occurrence of trematoda ova, *Haplotrema constrictum* (Leared), in fibro-epithelial tumors of the marine turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus). *Zoologica* 24:379-382.
- Spotila J.R., O'Connor M.P. y Paladino F.V. 1997. Terrestrial Biology. En: P.L. y J.A. Musick (eds). *The biology of sea turtles Vol.1*. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida. 297-314.
- Stancyk S.E. 1995. Non-human predators of sea turtles and their control. En: Bjorndal K.A. (ed). *Biology and conservation of sea turtles*. Smithsonian Institute, Washington. 139-152.
- Stegeman J.J., M. Brouwner, R.T. Di Giulio, L. Förlin, B.A. Fowler, B.M. Sanders y P.A. Van Veld. 1992. Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. En: Hugget R.J., R.A. Kimarle, P.M. Mehrle Jr. y H.L. Bergman (eds.). *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida. 272-315.
- Storey K.B. 1996a. Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 113 (1): 23-35.
- Storey K.B. 1996b. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29 (12): 1715-1733.
- Stryer L. 1995. *Bioquímica Vol. 1*. Edit. Reverté. 4a. Ed., México D.F. 440 pp.

- Sueoka E. y H. Fujiki. 1997. Carcinogenesis of okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural products. En: Reguera B., J. Blanco, M.L. Fernández y T. Wyatt. Harmful Algae. VIII International Conference Proceedings. 573-576.
- Suzuki K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: Taniguchi N. y Gutteridge M.C.J. (eds.). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press, Oxford, N.Y. 91-95.
- Swimmer J.Y. 2000. Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. *Journal of Wildlife Diseases*, 36 (1):102-110.
- Thomas S., J.E. Lowe, R.G. Knowles, I.C. Green y M.H.L. Green. 1998. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutation Research* 402: 77-84.
- Tsuchida S. 2000. Glutathione transferase. En: Taniguchi N. y Gutteridge M.C.J. (ed.). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press., Oxford, U.K., 82-85.
- Tsuchida S. y K. Sato. 1992. Glutathione transferases and cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27 (4,5): 337-384.
- U.S. Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior. 1997. Synopsis of the biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758). Biological report 97 (1): 120 pp.
- Viarengo A., L. Canesi, M. Pertica y D.R. Livingstone. 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 100 (1-2): 187-190.
- Wibbels T. 2000. Determinación del sexo de tortugas marinas en hábitats de alimentación. En: Eckert K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (eds.). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas (traducción al español). Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4. 160-164.
- Willmore W.G. y K.B. Storey. 1997a. Antioxidant systems and anoxia tolerance in freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 170:177-185.
- Willmore W.G. y K.B. Storey. 1997b. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. *American Physiological Society* R219-R225.

- Winston G.W. y R.T. Di Giulio. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19: 137-161.
- Wolke RE, George A. 1981. Sea Turtle Necropsy Manual. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-24, U.S. Department of Commerce, Panama City, Florida.pp.
- Work T.M. y G.H. Balazs. 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases* 35 (4): 804-807.
- Work T.M., G.H. Balazs, R.A. Rameyer, S.P. Chang y J. Berestecky. 2000. Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Chelonia mydas*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 74:179-194.
- Yagi K. 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. En: Armstrong D. (ed.). *Methods in molecular biology: free radical and antioxidant protocols* Vol. 108. Humana Press Inc., Totowa, N.J. 299-314.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical análisis*. 4ª. Ed. Prentice Hall, New Jersey. 123 pp.
- Zenteno-Savín T. 2002. Oxidative stress in marine organisms: a review. En: Johnson P. y Boldyrev A.A. (eds.). *Oxidative stress at molecular, cellular and organ levels*. Research Signpost. Kerala, India. 68-76.

APÉNDICES

Apéndice I. Datos biométricos, tipo de muestra y fecha en la que se realizaron las necropsias de las tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*) libres de FP muertas en redes de pesca en Baja California, México.

Clave (Fecha/No.)	LRC (cm)	Edad	Sexo	Zona	Muestras
30202-01	43.0	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Ri
30202-02	43.3	S	I	BM	Hi, Mu
050202-01	54.3	S	I	BM	Mu, Ri
080202-01	76.9	A	H	BM	Co, Mu, Ri
120202-01	54.4	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Ri
160202-01	44.0	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Ri
250302-02	59.0	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Pu, Ri
270302-01	70.0	A	H	BM	Co, Hi, Mu, Ri
270302-02	60.0	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Pu
280302-01	73.0	A	H	BM	Co, Hi, Mu, Pu, Ri
280302-02	75.5	A	H	BM	Co, Hi, Mu, Ri
280302-03	49.0	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Pu, Ri
230302-01	76.0	A	H	BM	Co, Hi, Mu, Pu, Ri
200402-01	54.9	S	I	BM	Co, Hi, Mu
110602-01	66.0	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Pu, Ri
110602-03	49.2	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Ri
070802-01	55.0	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Pu, Ri
70902-02	No	No	I	BM	Co, Hi, Mu, Ri
280902-03	52.5	S	I	BM	Co, Hi, Mu, Pu, Ri

LRC = largo recto del carapacho, S = subadulto, A = adulto, I = indeterminado, H = hembra, BM = Bahía Magdalena, Co = corazón, Hi = hígado, Mu = músculo, Pu = pulmón, Ri = riñón, SA = sana (sin fibropapilomas).

Apéndice II. Datos biométricos, fecha y zona de captura de las tortugas negras (*Chelonia mydas agassizii*) libres de FP capturadas vivas para toma de sangre en Baja California, México.

Clave (Fecha/No.)	LRC (cm)	Peso (kg)	Edad	Sexo	Zona
60802-01	87.5	100.00	A	H	BM
60802-03	48.4	30.00	S	I	BM
60802-01	88.7	87.09	A	H	BLA
60802-02	71.5	49.44	A	H	BLA
70802-01	55.0	35.00	S	I	BM
100802-01	67.5	34.24	S	I	BLA
100802-02	69.8	43.09	S	I	BLA
110802-01	70.7	37.42	A	H	BLA
130802-01	No	No	No	No	BLA
140802-02	73.7	No	A	M	BLA
140802-03	64.7	50.80	S	I	BLA
140802-04	65.6	50.80	S	I	BLA
150802-01	54.6	56.70	S	I	BLA
150802-02	52.7	No	S	I	BLA
160802-01	74.0	45.63	A	H	BLA
300802-02	48.7	16.30	S	I	PAO
300802-03	88.0	45.36	A	H	PAO
300802-06	68.2	45.36	S	I	PAO
51002-01	No	No	No	No	BM
280902-02	57.5	24.90	S	I	PAO
290902-01	70.0	50.00	A	H	PAO
290902-02	58.4	27.00	S	I	PAO
290902-05	72.3	59.00	A	H	PAO
121002-02	54.0	20.00	S	I	PAO
121002-03	55.7	25.40	S	I	PAO
121002-08	73.0	55.00	A	M	PAO
121002-09	62.6	35.00	S	I	PAO
121002-10	51.7	17.00	S	I	PAO
121002-12	62.7	32.00	S	I	PAO
121002-13	61.0	34.00	S	I	PAO
91102-02	59.5	No	S	I	PAO
91102-03	55.5	15.00	S	I	PAO
91102-04	59.0	23.00	S	I	PAO
91102-05	50.0	12.00	S	I	PAO
91102-06	51.0	14.00	S	I	PAO
91102-07	55.6	18.00	S	I	PAO
070403-02	53.0	21.30	S	I	PAO

070403-03	42.0	9.90	S	I	PAO
070403-04	51.0	15.80	S	I	PAO
070403-05	50.9	18.10	S	I	PAO
070403-06	65.5	33.10	S	I	PAO
070403-07	50.3	17.60	S	I	PAO
070403-08	52.7	17.20	S	I	PAO
070403-09	54.8	22.20	S	I	PAO
070403-10	47.0	13.60	S	I	PAO
070403-11	54.0	21.30	S	I	PAO
070403-12	64.0	37.10	S	I	PAO
070403-13	48.9	15.40	S	I	PAO
070403-14	64.8	36.20	S	I	PAO
070403-15	50.5	21.30	S	I	PAO
070403-16	53.0	18.10	S	I	PAO
070403-17	57.6	24.90	S	I	PAO
070403-18	54.5	20.40	S	I	PAO
070403-19	63.0	29.40	S	I	PAO
070403-20	54.2	21.30	S	I	PAO
070403-21	54.3	23.50	S	I	PAO
070403-22	58.5	29.40	S	I	PAO
070403-23	57.8	27.20	S	I	PAO
070403-24	49.2	14.50	S	I	PAO
070403-25	73.0	59.80	A	H	PAO
070403-26	73.4	62.50	A	H	PAO
070403-27	59.7	30.30	S	I	PAO
070403-28	47.6	15.80	S	I	PAO
070403-29	59.0	28.50	S	I	PAO
070403-30	56.0	27.20	S	I	PAO
070403-31	51.0	16.32	S	I	PAO
070403-32	67.1	41.20	S	I	PAO
070403-33	51.5	18.50	S	I	PAO
070403-34	47.0	13.10	S	I	PAO
070403-35	49.3	17.20	S	I	PAO
070403-37	62.7	32.20	S	I	PAO
070403-38	57.0	22.60	S	I	PAO

LRC = largo recto del carapacho, S = subadulto, A = adulto, I = indeterminado, H = hembra, M = macho, BLA = Bahía de los Angeles, BM = Bahía Magdalena, PAO = Punta Abreojos.

Apéndice III. Datos biométricos y zona de colecta de las tortugas verdes (*Chelonia mydas*) capturadas el 14 y 15 de octubre del 2002 en las Islas de Hawaii, E.U.A.

Clave	LRC (cm)	Peso (kg)	Edad	Zona	Muestras	FPS
Hi-1	43.6	11.8	S	Kailua	San	0
Hi-2	50.7	17.2	S	Kailua	San, Tu	2
Hi-3	42.6	12.7	S	Kailua	San	0
Hi-4	51.8	21.3	S	Kailua	San, Tu	2
Hi-5	58.2	23.6	S	Kailua	San, Tu	1
Hi-6	69.3	42.2	S	Kailua	San, Tu	3
Hi-7	75.9	49.9	A	Kailua	San, Tu	3
Hi-8	40.0	9.5	S	Kailua	San, Tu	1
Hi-9	43.6	11.8	S	Kailua	San	0
Hi-10	50.7	17.2	S	Kailua	San, Tu	2
Hi-11	42.6	12.7	S	Kailua	San	0
Hi-12	51.8	21.3	S	Kailua	San, Tu	2
Hi-13	69.3	42.2	S	Kailua	San, Tu	3
Hi-14	75.9	49.9	A	Kailua	San, Tu	3
Hi-15	70.5	No	A	Kanehoe	San, Tu	3
Hi-16	46.0	12.2	S	Kanehoe	San	0
Hi-17	57.6	31.3	S	Kanehoe	San, Tu	3
Hi-18	46.7	13.2	S	Kanehoe	San	0
Hi-19	70.3	46.3	A	Kanehoe	San	0
Hi-20	60.5	30.8	S	Kanehoe	San, Tu	3
Hi-21	52.5	15.4	S	Kanehoe	San, Tu	2

LRC = largo recto del carapacho, S = subadulto, A = adulto, H = hembra, M = macho, I = indeterminado, San = sangre, Tu = tumores, FPS = FP score severity: 0 = sin FP, 1 = daño ligero, 2 = daño considerable, 3 = daño severo, 4 = daño grave.