



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

EFECTO AMBIENTAL SOBRE DIFERENTES PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEMATOLÓGICOS EN PINGÜINOS DE MAGALLANES DE LA COSTA PATAGÓNICA



Tesista: Lic. Eliana Carabajal

Director: Dr. Marcelo Bertellotti

Co-Director: Dra. Vanina A. Medina

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
2017



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

EFECTO AMBIENTAL SOBRE DIFERENTES
PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y
HEMATOLÓGICOS EN PINGÜINOS DE
MAGALLANES DE LA COSTA PATAGÓNICA

Lic. Eliana Carabajal
Tesisista

Dr. Marcelo Bertellotti
Director

Dra. Vanina A. Medina
Co-Director

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
2017



“Lo que sabemos es una gota de agua.

Lo que ignoramos es el océano”.

Issac Newton (Matemático y Físico).

RECONOCIMIENTOS

A las autoridades de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, por permitirme la posibilidad de realizar mi doctorado en dicha facultad.

Al Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Departamento de Físico-matemática, por brindarme el espacio de laboratorio y mucho de los materiales para poder realizar este trabajo.

Al Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), CENPAT-CONICET, Puerto Madryn por recibirme y otorgarme un lugar para trabajar y realizar los muestreos correspondientes.

Al CONICET, por concederme la beca, permitiendo el desarrollo de mi tesis doctoral.

A la Secretaría de Turismo y Áreas Protegidas y el Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Chubut y Santa Cruz, por autorizar los permisos de investigación para la toma de muestras y traslado de las mismas.

Al Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, España (MNCN-CSIC), por el intercambio de técnicas.

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta tesis de doctorado con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento apoyándome y brindándome su amor. A mis hermanas, Na, Cami, a mis sobrinos Felu, Santi y Toto, les agradezco de todo corazón que estén a mi lado en este momento tan especial.

A mi gran amor Diego y a mi pichoncito Franco, siempre a mi lado con una sonrisa que me ilumina todos los días.

A toda mi familia, a mis amigos del alma, los viejos (Sole, Ochi, Barbi, Angi, Juli) y los nuevos, el grupo de la veci, mis compa del trabajo, principalmente a Belu, Carla, gracias por estar siempre a mi lado dándome fuerzas y seguridad, por su compañía durante todo el periodo de realización de mi carrera y mi vida; ayudándome a crecer y madurar como persona, por apoyarme incondicionalmente en todas las circunstancias, por no dejarme bajar los brazos, escucharme y aconsejarme.

A Roger compañero de campañas por una temporada.

Este trabajo no se hubiese podido realizarse sin la cooperación y compañía de mi Co-Directora, mi amiga Vanina, quien no dejaba de estar a mí lado enseñándome, aconsejándome y guiándome. Gracias Vani, por estar siempre presente pese a la distancia, sos una genia!.

A mi Director Marcelo, gracias por la paciencia y generosidad. A Verónica por ayudarme con una de las técnicas.

Así mismo quiero dar especialmente las gracias a la Dra. Elena Rivera por dejarme participar en su grupo de investigación, también a Noe, Mariel, Diego, Meli, Clari y todas los investigadores de la Cátedra de Radioisótopos, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica, por sus brillantes criterios científicos y sus apreciados afectos.

Son muchas personas que debería nombrar en estas líneas de agradecimiento, sin la ayuda y buena onda de todos ellos no hubiera sido posible, por lo que quiero transmitirles mi más profundo agradecimientos.

Infinitas gracias...

TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Parte de los resultados de esta tesis doctoral, han sido publicados en revistas científicas:

Carabajal E, D'Amico V, Medina VA, Bertellotti M. Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en Pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo. Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) 2016, 24 (2): 87-96.

Roger Colominas-Ciuró, Marcelo Bertellotti, **Eliana Carabajal**, Verónica L. D'Amico, Andrés Barbosa. Incubation induces high oxidative costs compared to chick rearing in a seabird, the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). Mar Biol. 2017;164:99, DOI: 10.1007/s00227-017-3139-4.

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral, han sido comunicados en reuniones científicas:

Evento: **9TH INTERNATIONAL CONGRESS OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY**. From Molecules to Macrophysiology. 2015 August 23-28, Krakow, Poland. R Coloninas-Ciuró, **E Carabajal**, V D'Amico, M Bertellotti, A Barbosa. Oxidative status during reproduction in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*): incubation versus chick rearing. Libro de resúmenes PO- 23.1.

Evento: **V JORNADA DE BECARIOS CENPAT-CONICET**. 14-15 Mayo 2015, Puerto Madryn, Chubut. **Carabajal E**, Medina V, Bertellotti M. Los pingüinos se estresan. Oral.

Evento: **XXVI Reunión Argentina de Ecología (RAE)- Predio Ferial 2-5 Noviembre 2014, Comodoro Rivadavia, Chubut**. **Carabajal E**, Medina V, D'Amico V, Palacios G, Frere E, Morgenthaler A, Bertellotti M. Estrés oxidativo en dos colonias de Pingüinos de Magallanes de la Patagonia. Libro de resúmenes PO- 29, pág. 36.

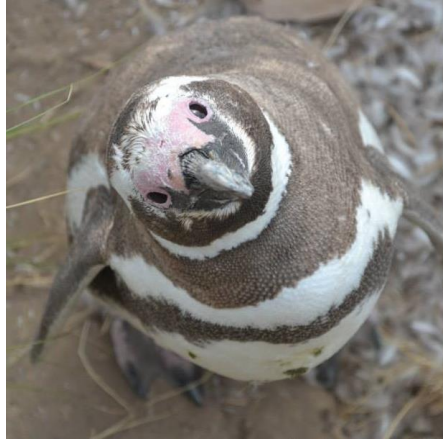
Evento: **CONGRESO IBEROAMERICANO DE TOXICOLOGÍA**. III Congreso Iberoamericano de Salud Ambiental para el Desarrollo Sustentable- Centro Cultural 24-26 Septiembre 2014, Comodoro Rivadavia, Chubut. **Carabajal E**, Medina V, D'Amico V, Bertellotti M. Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en Pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo. Libro de resúmenes PO- 63, pág. 35. **Este trabajo obtuvo el primer premio "35 años de la Asociación Toxicológica Argentina"**.

Evento: **IV JORNADA DE BECARIOS CENPAT-CONICET**. 15-16 Mayo 2014, Puerto Madryn, Chubut. **Carabajal E**, Saban D, Medina V, Vera Piombo M, D'Amico V, Bertellotti M. Efecto del tiempo de manipulación en el estrés oxidativo en pichones de pingüinos de Magallanes. Libro de resúmenes PO-37 pág. 37

Carabajal E, Medina V, Bertellotti M. Evaluación de marcadores del estrés oxidativo y parámetros fisiológicos en pingüinos de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) de diferentes colonias de la costa patagónica. Libro de resúmenes PO-38, pág 38.

Evento: **XV REUNIÓN ARGENTINA DE ORNITOLOGÍA**. Universidad Nacional de la Pampa 18-21 Septiembre 2013, Santa Rosa, La Pampa. **Carabajal E**, Palacios G, D'Amico V, Longarzo L, Dodino S, Medina V, Bertellotti M. Evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo en Pingüinos de Magallanes (*Spheniscus Magellanicus*). Libro de resúmenes PO-9 pág. 51.

Índice



|

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	4
Indicadores fisiológicos.....	4
Indicadores ambientales.....	9
Especie en estudio: el pingüino de Magallanes.....	10
Impactos antropogénicos en los pingüinos de Magallanes.....	12
Colonia de pingüinos de la Estancia San Lorenzo.....	14
Colonia de pingüinos en Isla Quiroga.....	16
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Área de estudio.....	21
Toma de muestra.....	21
Medidas morfométricas.....	22
Análisis hematológicos.....	23
Parámetros de estrés oxidativo	25
Análisis estadístico.....	29
Consideraciones éticas.....	29

Evaluación del tiempo de manipulación en parámetros de estrés oxidativo.....	30
RESULTADOS 1: Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes de la colonia San Lorenzo, Chubut.....	33
DISCUSIÓN 1	55
RESULTADOS 2: Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes de la colonia Isla Quiroga, Santa Cruz.....	64
DISCUSIÓN 2	77
RESULTADOS 3: Comparación de los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes que anidan en las colonias de San Lorenzo y de Isla Quiroga.....	80
DISCUSIÓN 3	84
RESULTADOS 4: Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes rehabilitados por manchas de petróleo.....	86
DISCUSIÓN 4	96
CONCLUSIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS	100
BIBLIOGRAFÍA	104
ABREVIATURAS	122

RESUMEN

El estudio y monitoreo de poblaciones sujetas a disturbios humanos es esencial para poder identificar y cuantificar los impactos sobre los animales y determinar estrategias de manejo y conservación adecuadas. Los indicadores fisiológicos pueden alertar sobre cambios en el estado de los individuos aún antes de que estos afecten negativamente su capacidad reproductiva o su supervivencia, permitiendo así la detección temprana del problema y la toma de medidas para mitigarlo. Existen diferentes indicadores fisiológicos para medir los efectos de la alteración del ambiente en los organismos. Entre ellos se destacan los marcadores de estrés oxidativo, los parámetros hematológicos, que pueden actuar como sensibles señales del estado de salud y algunas enzimas del metabolismo de aminoácidos o carbohidratos, que son indicativas del daño tisular provocado por compuestos tóxicos.

Entre los impactos de origen humano que pueden afectar a los pingüinos de Magallanes se encuentran las actividades que se desarrollan en la costa, como el ecoturismo y la generación de contaminantes en el mar, especialmente los derrames de hidrocarburos. El estrés producido por las visitas en las colonias reproductivas podría provocar cambios fisiológicos que disminuyen la condición física de los animales, volviéndolos más susceptible a contraer enfermedades. En tanto que los contaminantes ambientales pueden producir peroxidación lipídica desencadenando la pérdida de la funcionalidad celular bajo condiciones de estrés oxidativo.

Para medir el efecto de estos estresores, se estudiaron dos colonias de pingüinos, una expuesta al turismo (Estancia San Lorenzo, Chubut) y otra cercana a un puerto y a la ciudad y por lo tanto exhibida a contaminantes (Isla Quiroga, Santa Cruz). El objetivo en la primera sección fue determinar si el turismo tiene efectos negativos sobre los pingüinos, comparando individuos que anidan cerca de los senderos por donde circulan los visitantes con nidos en zonas no disturbadas (control). Para ello se midieron diferentes parámetros hematológicos y de estrés oxidativo. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros hematológicos. Sin embargo, se observó que animales

expuestos al turismo presentaron mayores niveles del biomarcador de daño oxidativo ROMs y menores niveles de tioles, un reconocido antioxidante, conjuntamente con un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión transferasa y catalasa, probablemente para compensar el aumento del estrés oxidativo. Por otra parte, se consideró la influencia de otros factores como el sexo, la edad y la zona de anidación. Los pichones mostraron valores significativamente mayores de glucemia y colesterol, mientras que exhibieron menores valores de proteínas totales y de hematocrito que los adultos. También presentaban menores niveles de aspartato aminotransferasa, mientras que mostraron mayor actividad de la fosfatasa alcalina y de la pseudocolinesterasa, sin observar diferencias significativas en la alanina transaminasa y lactato deshidrogenasa, comparado con los individuos adultos. El estudio de OXY demostró menor capacidad antioxidante en pichones comparado con adultos, apreciándose diferencias significativas en los niveles de ROMs. Además, se observaron mayores niveles de TBARS y tioles en pichones y menor actividad de la enzima catalasa respecto de los adultos. Las hembras adultas presentaron mayores niveles de proteínas totales, niveles de aspartato y alanina aminotransferasas, además de un aumento en el número de leucocitos totales respecto de los machos.

En la segunda sección de resultados se analizaron los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos de la Isla Quiroga. Se registraron diferencias hematológicas entre adultos y pichones. Los pichones mostraron valores significativamente mayores de glucemia y colesterol, mientras que exhibieron menores valores de proteínas totales y de hematocrito. Además, los pichones mostraron niveles mayores de fosfatasa alcalina y pseudocolinesterasa. Con respecto a los parámetros de estrés oxidativo, no se registraron diferencias significativas entre pichones y adultos en ninguno de los parámetros estudiados excepto por una menor actividad de la enzima catalasa en pichones.

En la anteúltima sección se compararon los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de pingüinos que anidan en las colonias de San Lorenzo y de Isla Quiroga. El único parámetro que presentó el mismo comportamiento, independientemente del sexo y edad de los pingüinos, fue la glucemia que demostró menores niveles en los animales de

IQ. En individuos adultos de ambos sexos se registraron mayores niveles de peroxidación lipídica en plasma, conjuntamente con una reducción de antioxidantes, en los individuos provenientes de IQ. Sólo en machos se observaron niveles de actividad de las enzimas alanina aminotrasferasa y fosfatasa alcalina significativamente mayores en IQ. Los pichones de la colonia IQ presentaron menores niveles de TBARS y tioles en glóbulos rojos, pero contrariamente se registraron mayores niveles de tioles en plasma, OXY, hematocrito y proteínas totales.

En la última sección se evaluaron 3 pingüinos con manchas de petróleo que fueron rehabilitados. Los resultados mostraron que los pingüinos con ese leve empetrolamiento tenían valores hematológicos (excepto para hematocrito y proteínas totales) y de estrés oxidativo (excepto la actividad de enzima catalasa y tioles en glóbulos rojos) mayores en comparación con pingüinos de Magallanes de la zona control de la colonia San Lorenzo.

En el presente trabajo se reportan los datos de los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de los pingüinos de Magallanes, con el fin de reportar los rangos fisiológicos en los pingüinos, tanto los afectados por turismo y contaminantes, como de individuos que pueden considerarse normales. Estos resultados serán una herramienta indispensable para poder realizar una correcta evaluación del impacto ambiental sobre la especie.

Introducción



INTRODUCCIÓN

Indicadores fisiológicos

El estudio y monitoreo de poblaciones sujetas a disturbios humanos es esencial para poder identificar y cuantificar los impactos sobre los animales y determinar estrategias de manejo y conservación adecuadas. En particular, los indicadores fisiológicos pueden alertar sobre cambios en el estado de los individuos aún antes de que estos afecten negativamente su capacidad reproductiva o su supervivencia, permitiendo así la detección temprana del problema y la toma de medidas para mitigarlo (Carey 2005; Wikelski y Cooke 2006).

En los últimos años han adquirido un gran interés para la comunidad científica las investigaciones sobre la distribución y abundancia de los contaminantes ambientales y otras fuentes de impacto en los ecosistemas. Varios estudios fueron realizados en la península Antártica e islas asociadas, utilizando a los pingüinos como bioindicadores de los impactos antropogénicos, incluyendo la contaminación ambiental, evaluándose las actividades pesqueras, actividades turísticas, quema de combustibles para transportes y producción de energía, uso de pinturas y baterías, vertido o derrame de residuos sólidos y líquidos o incineración de residuos (Rodríguez 2012).

Existen diferentes indicadores fisiológicos para medir los efectos de la alteración del ambiente en los organismos, pero entre los más promisorios se encuentran los marcadores de estrés oxidativo (Monaghan y Col. 2009; Davico y Col. 2012; Selman y Col. 2012). Estos marcadores han sido de enorme aplicación diagnóstica en humanos (Masnatta y Col. 2003; Milei y Col. 2005) y más recientemente en animales silvestres (Davico y Col. 2012; Selman y Col. 2012). En los organismos aerobios, el oxígeno es esencial para la producción energética, pero paradójicamente, las reacciones de oxidación-reducción aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Limón-Pacheco y Gonsebatt 2009). El estrés oxidativo es un desbalance químico celular

que ocurre cuando hay una excesiva producción ERO o una ineficiente eliminación de éstas en el cuerpo. Las ERO, son moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno fruto del metabolismo celular normal (Dowling y Simmons 2009); se producen normalmente en las células como producto del metabolismo celular y su concentración es controlada por acción de los antioxidantes (Koivula y Eeva 2010). Las ERO a bajas concentraciones tienen efectos beneficiosos ya que participan en diferentes procesos fisiológicos tales como la defensa contra agentes infecciosos, los sistemas de señalización celular y la inducción de la respuesta mitogénica (Valko y Col. 2006).

Si un agente estresante produce un aumento en la producción de ERO, este equilibrio puede romperse causando daños en las estructuras celulares. Dichos daños serán reparados por mecanismos celulares específicos, pero si no se recupera el equilibrio se producirán disfunciones que pueden comprometer la viabilidad celular y por lo tanto, el correcto mantenimiento de las funciones biológicas (Halliwell y Gutteridge 2007).

Existen muchos factores o agentes estresantes que pueden desbalancear el equilibrio entre la cantidad de ERO y de antioxidantes. Éstos incluyen la radiación solar, la contaminación, el estrés, el ejercicio intenso, la disminución de alimentos antioxidantes en la dieta, entre otros (Martinez-Haro y Col. 2011). Más recientemente, los biólogos evolutivos y ecólogos han subrayado la importancia del estrés oxidativo como un mediador clave en la historia de vida de los organismos, donde probablemente juegue un papel relevante en el desarrollo y reproducción (incluyendo la señalización sexual honesta) (Von Schantz y Col. 1999; Monaghan y Col. 2009; Metcalfe y Alonso-Alvarez 2010; Costantini 2014).

Los sistemas antioxidantes son importantes en la protección de los organismos contra el estrés oxidativo. Los principales mecanismos para neutralizar las ERO incluyen las moléculas antioxidantes y las enzimas antioxidantes, y debido a ello, algunos de estos compuestos se han utilizado como marcadores de estrés oxidativo en animales silvestres para medir el efecto de diferentes componentes de la dieta (Pérez y Col. 2008; Pérez-Rodríguez y Col. 2015) y contaminantes (Martinez-Haro y Col. 2011). Por ejemplo, se ha utilizado la medición de parámetros de estrés oxidativo y hematológicos para evaluar

contaminantes en una población de aves rapaces que mostró una marcada disminución poblacional (Newton y Wyllie 1992; Newman 2000). La evaluación de estos marcadores se considera una herramienta de gran utilidad en el monitoreo ambiental (Herrera-Dueñas y Col. 2014).

Entre los antioxidantes más importantes se incluye el glutatión (GSH), debido a su participación directa en la unión con las ERO (Swiergosz Kowalewska y Col. 2006). En tanto que son de suma importancia las enzimas antioxidantes que actúan como catalizadores en reacciones relacionadas con la defensa antioxidante. La catalasa, es una de las enzimas más eficaces, tanto que no puede ser saturada por peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2 , para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción de diferentes hiperóxidos ($ROOH$ y H_2O_2) usando glutatión reducido (GSH), contribuyendo a la protección de células de mamíferos contra el daño oxidativo. La glutatión-S-transferasa, cataliza el ataque nucleofílico del co-sustrato de glutatión sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes (Díaz y Col. 2004) y está involucrada en el metabolismo de xenobióticos tales como los plaguicidas. Muchos compuestos son metabolizados por conjugación con GSH previo a su eliminación. La enzima superóxido dismutasa representa una de las primeras línea de defensa antioxidante, catalizando la reacción de destrucción del radica superóxido mediante su transformación en H_2O_2 , que a su vez, puede ser catabolizado por las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa (Ercal y Col. 2001; Pinto y Col. 2003). También están los tioles totales no proteicos, que son compuestos orgánicos que contienen grupos sulfhidrilos, y juegan un papel importante en la defensa contra las ERO (Costantini y Bonadonna 2009).

Por otra parte, los contaminantes ambientales pueden producir peroxidación lipídica lo que podría conducir a la pérdida de la funcionalidad celular bajo condiciones de estrés oxidativo. Una de las técnicas más comúnmente utilizadas para medir los niveles de peroxidación lipídica es la evaluación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ochoa y González 2008).

Para la evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma, se utiliza la técnica de OXY-adsorbente. Este ensayo permite evaluar la capacidad plasmática para contrarrestar la oxidación masiva por acción de una solución de ácido hipocloroso (HClO). Por su parte, la prueba d-ROM mide las hidroperoxidasas plasmáticas, metabolitos reactivos del oxígeno (ROM) resultantes del ataque de ERO sobre sustratos orgánicos (carbohidratos, lípidos, aminoácidos, proteínas, nucleótidos) (Beaulieu y Col. 2010). Ambas técnicas son sensibles y ampliamente utilizadas en los últimos años para evaluar el estrés oxidativo en animales silvestres (Beaulieu y Col. 2010; Costantini 2010; Beaulieu y Col. 2010, Colominas-Ciuró y Col. 2017).

Varios autores sugieren que es esencial utilizar diferentes biomarcadores puesto que un biomarcador normalmente no es suficiente para describir completamente el mecanismo de estrés (Berglund y Col. 2007; Koivula y Eeva 2010). En este sentido, Halliwell y Gutteridge (1999) concluyeron que no existe un biomarcador universal para estrés oxidativo. Según Costantini y Verhulst (2009), la capacidad antioxidante total o los niveles de un determinado tipo de antioxidante como marcadores de estrés oxidativo sin información adicional sobre daño oxidativo o producción de radicales libres no son suficientes para hacer deducciones sobre estrés oxidativo. Se debe tener en cuenta que altos niveles de ERO no provocan necesariamente estrés oxidativo, ya que pueden ser equilibrados mediante un aumento de las defensas antioxidantes.

En condiciones estables y constantes o de homeostasis, tanto los niveles de ERO como de antioxidantes son bajos, y las defensas son suficientes para equilibrar la producción de ERO, no habiendo estrés oxidativo (Fig. 1a) (Monaghan y Col. 2009). Se debe tener en cuenta que es improbable que el valor de estrés oxidativo sea exactamente cero, ya que los agentes pro-oxidantes se producen continuamente y por tanto, siempre se genera algo de daño oxidativo (Costantini y Verhulst 2009). Si se produce un aumento en la producción de ERO, inicialmente se puede exceder la capacidad antioxidante, produciéndose un periodo de estrés oxidativo (Fig. 1b). Si el aumento de ERO es pequeño, se puede igualar mediante un aumento en los niveles antioxidantes, previniendo que se produzca más estrés oxidativo (Fig. 1c). Si este aumento de ERO es temporal, se volverá a

la situación de estabilidad (Fig. 1a). Sin embargo, un aumento prolongado de ERO puede provocar un aumento permanente de los niveles base de antioxidantes en el organismo (Fig. 1d), siendo así más fácil equilibrar futuros periodos oxidativos (Monaghan y Col. 2009).

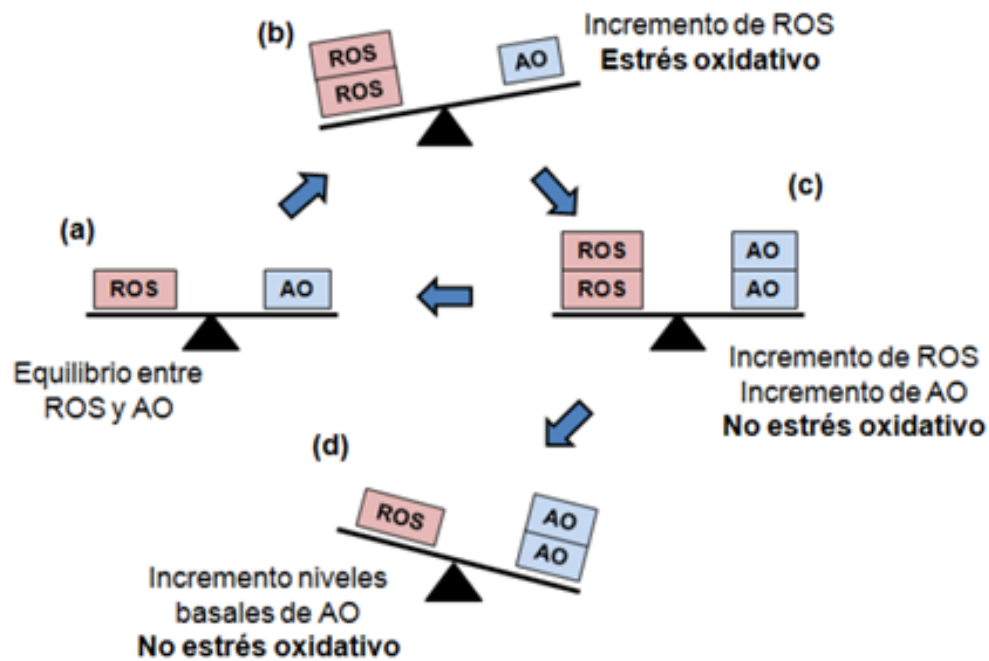


Fig. 1 Relación entre las EROS (ROS), los niveles de antioxidantes (AO) y el estrés oxidativo (Extraído de Monaghan y Col. 2009).

También se debe tener en cuenta que, aunque se produzca un aumento de las defensas antioxidantes, esto no implica la prevención del daño oxidativo, ya que la efectividad de este aumento dependerá de la medida en que se anule el aumento de ERO (Monaghan y Col. 2009). Por tanto, como sugieren Costantini y Verhulst (2009), un marcador de capacidad antioxidante debe ir asociado con, al menos, un marcador de daño oxidativo cuando se pretende evaluar el estrés oxidativo.

Por su parte, los parámetros hematológicos son ampliamente utilizados como indicadores fisiológicos, pudiendo actuar como sensibles señales de alerta temprana de los posibles efectos en la salud y el estado fisiológico del animal (Weeks y Col. 1992). Dentro de los parámetros hematológicos se estudian el hematocrito, la glucemia, el colesterol y las

células sanguíneas, donde se calcula la relación heterófilos/linfocitos (H/L), la cual es ampliamente utilizada para estimar el estrés fisiológico en aves (Maxwell 1993; Castillo Torres 2015).

También, algunas enzimas del metabolismo de aminoácidos como la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST), aumentan sus niveles por destrucción o cambio de permeabilidad de las membranas celulares que ocurre por alteraciones hepáticas (Bergmeyer y Horder 1980).

La ALT está presente en muchos tejidos, se ha encontrado en las palomas que se encuentra en varios tejidos y es particularmente abundante en el hígado, pero no hay elevaciones considerables tras lesión física en este órgano. También está en altas concentraciones a nivel renal pero la destrucción celular suele causar elevaciones en orina, más que en sangre. En otras aves analizadas, aun teniendo el hígado lesionado, los valores de ALT permanecían dentro de los niveles normales. Las elevaciones de ALT en aves pueden ser debidas incluso a hemólisis y se consideran un indicador inespecífico de daño celular (Hochleitnhner 1994; Fudge 2000). La AST es más sensible como indicador de lesión hepática, pero es poco específica ya que también se encuentra en altas concentraciones en otros tejidos (músculo esquelético y cardíaco, riñón o cerebro). Valores elevados son indicativos de daño celular inespecífico (Hochleitnhner 1994; Fudge 2000).

Además, las enzimas del metabolismo de carbohidratos como la lactato deshidrogenasa (LDH), son indicativas del daño tisular provocado por compuestos tóxicos (Peakall 1992). La LDH está localizada principalmente en hígado, corazón y músculo esquelético. El incremento sérico de esta enzima es indicador de daño tisular, inflamación, infecciones y necrosis (Bergmeyer y Horder 1980).

La contaminación del ambiente acuático es un fenómeno de gran importancia producido por el aporte de innumerables compuestos tóxicos provenientes tanto de aportes naturales como de xenobióticos, entre ellos se encuentran los metales pesados, hidrocarburos, dioxinas, pesticidas, entre otros. Estos pueden afectar al hígado (Ochoa 2008) produciendo un aumento de las enzimas hepáticas.

Indicadores ambientales

El estudio hematológico, bioquímico y de estrés oxidativo evaluado en sangre puede ser de gran utilidad para el conocimiento de la fisiología y la adaptación de las especies al medio. Es también una parte importante en el estudio clínico, ya que puede aportar información de interés a la hora de confirmar un diagnóstico, seguir la evolución o determinar el grado de importancia de un proceso patológico. Tanto en uno como en otro caso la interpretación de los resultados pasa por la determinación de la normalidad de los datos obtenidos y, en su caso, del grado de desviación que presenta un parámetro frente a lo esperado. Para ello se hace absolutamente imprescindible el disponer de datos normales o de referencia para la especie que nos permitan interpretar los valores obtenidos en un determinado individuo. Existe muy poca información disponible sobre los valores normales en la familia *Spheniscidae* y aún menos en la especie *Spheniscidae magellanicus*.

Las aves marinas son consideradas como buenos indicadores del ambiente debido a su amplia distribución, su relativa facilidad de identificación y su papel como componente fundamental de los ecosistemas acuáticos, siendo especialmente sensibles a los cambios que se producen por influencia humana en los hábitats que ocupan (Burger 1993). Para estudiar la contaminación ambiental, las aves acuáticas pueden acumular las formas biológicamente disponibles de los contaminantes, por lo tanto pueden reflejar fenómenos potenciales de bioconcentración y biomagnificación de contaminantes persistentes, por estar situadas en niveles altos de las cadenas tróficas y presentar ciclos de vida largos (Burger y Gochfeld 2004; Roomen y Col. 2006).

El pingüino de Magallanes es el ave marina más importante como recurso turístico, la intensa actividad humana puede provocar cambios en su fisiología, por eso resulta necesario obtener indicadores fidedignos del impacto del turismo sobre las colonias

reproductivas, constituyéndose como herramientas de monitoreo, para el desarrollo de un turismo responsable en la región.

Por otra parte, el pingüino de Magallanes es una de las especies más afectadas por la contaminación derivada de la actividad portuaria y las industrias pesqueras (Gandini y Frere 1996).

Entender y predecir las consecuencias probables del disturbio antrópico sobre las especies y los ecosistemas es un requisito importante para lograr el uso sostenible de los recursos naturales.

Especie de estudio: el pingüino de Magallanes

El pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) (Fig. 2) es un ave marina colonial, que nidifica a lo largo de la costa sudamericana desde la Isla Algarrobo en Chile, hasta el complejo Islote Lobos en Río Negro, Argentina y en Islas Malvinas (Schiavini y Col. 2005; Bertellotti 2013). Las colonias se forman durante la etapa reproductiva y en Argentina existen 63 colonias con una población total estimada en 950,000 parejas reproductivas (Schiavini y Col. 2005; Bertellotti 2013).

El Pingüino de Magallanes presenta un ligero dimorfismo sexual, siendo los machos entre un 5 y un 15% más grandes que las hembras (Agnew y Kerry 1995). Aunque existen métodos moleculares para diferenciar genéticamente los sexos, se han desarrollado funciones discriminantes muy precisas que permiten estimar el sexo a través de medidas morfométricas, con la ventaja del reducido costo y la velocidad del resultado. Así, las medidas que mejor diferencia los sexos es el alto y largo del pico (Bertellotti y Col. 2002). Usando ambas longitudes se puede determinar con un 97% de exactitud el sexo de los individuos adultos. Los machos tienen mayor pico (ancho y largo) y tamaño del ala, y son más pesados que las hembras (Tabla 1) (Bertellotti y Col. 2002).



Fig. 2 Pingüino de Magallanes de la costa Patagónica.

Luego de pasar el invierno en las costas de Brasil, más de 200 mil parejas de pingüinos de Magallanes arriban a las costas chubutenses a mediados de septiembre para reproducirse. Los primeros en llegar son los machos, que defienden y aclimatan los nidos de la temporada pasada, antes de la llegada de las hembras, 2 ó 3 semanas más tarde (Boersma y Col. 1990, Bertellotti 2013). Cuando un individuo macho alcanza la madurez sexual, alrededor de los 4 o 5 años (Bertellotti 2013), buscará una hembra a través de luchas, muchas veces tan violentas que acaban con la muerte de uno de los pretendientes (Boersma y Col. 1990; Gandini y Col. 1996).

Los nidos pueden estar debajo de arbustos o ser cuevas excavadas en el suelo arcilloso característico de esta área (Boswall y MaacIver 1975). La puesta de los huevos es a fines de septiembre y cada hembra pone dos, luego de unos cuarenta días de incubación (Rebstock y Boersma 2011; Frere y Col. 1996), nacen los pichones que al nacer pesan alrededor de 80 gr. y presentan un plumón uniforme de color gris (Boersma y Col. 1990; Frere y Col. 1998; Yorio y Col. 2001). Las principales causas de pérdida de huevos es la depredación y la deserción debido a las condiciones climáticas (Frere y Col. 1998) o a la

condición física de los padres (Yorio y Boersma 1994). Mayormente las hembras toman el primer turno de incubación que dura 15 días (desde que finaliza la puesta), el otro individuo aprovecha a ir al mar en busca de alimento (calamares, pejerreyes, sardinas y anchoítas) realizando breves buceos. Luego, los machos incuban los huevos alrededor de 17 días y finalmente se turnan en turnos cortos hasta la eclosión (Boersma y Col. 1990; Yorio y Boersma 1994). Los pichones nacen aproximadamente en la segunda quincena de noviembre (Williams y Boersma 1995), y logran independizarse entre 70 a 120 días después de haber nacido.

Finalizada la temporada reproductiva, entre marzo y abril, luego de cambiar todas sus plumas (muda) los pingüinos migran hacia el norte (Uruguay y sur de Brasil), permaneciendo en el mar todo el invierno, alimentándose y recuperando energías para la siguiente temporada y recomenzar el ciclo (Williams y Boersma 1995; Davis y Renner 2003; Bertellotti 2013).

Impactos antropogénicos en los pingüinos de Magallanes

Entre los impactos directos de origen humano que pueden afectar a los pingüinos de Magallanes se encuentra el turismo. Esta actividad en Patagonia se realiza en senderos que recorren parte de las colonias reproductivas y los visitantes caminan entre los nidos, muchas veces afectando el comportamiento reproductivo o interrumpiendo los desplazamientos de las aves hacia o desde el mar. A pesar de que los pingüinos se acostumbran a la presencia humana, es posible que manifiesten algún grado de estrés. El estrés producido por las visitas podría entonces provocar cambios fisiológicos que disminuyan la condición física de los pingüinos, volviéndolos más susceptible a contraer enfermedades (Seddon y Ellenberg 2007).

Por otro lado, el pingüino de Magallanes es la especie más afectada por la contaminación por hidrocarburos en la costa patagónica (Gandini y Col. 1994; Boersma y Williams 1995; Bertellotti 2013). Estos pingüinos recorren grandes distancias nadando en la superficie durante sus viajes de alimentación o durante sus migraciones, muchas veces coincidiendo

con las áreas de explotación y tránsito de buques petroleros, resultando especialmente susceptibles al empetrolamiento (Bertellotti 2013; Carabajal y Col. 2016). Las aves empetroladas pierden la capacidad aislante de su plumaje y en consecuencia, no pueden ingresar al mar para alimentarse. También se intoxican por la ingestión directa del petróleo cuando intentan limpiarse las plumas (Wiese y Ryan 2003; Bertellotti 2013).

La exposición a contaminantes como los hidrocarburos, provoca en los animales graves daños fisiológicos (Harvey y Col. 1999; Golet y Col. 2002; Laffon y Col. 2006). Se han documentado alteraciones hematológicas (Anselstetter y Heimpel 1986; Canepuccia y Col. 1999; Balseiro y Col. 2005), daños tóxicos que afectan al hígado y riñones (Golet y Col. 2002; Alonso Álvarez y Col. 2007), daños genotóxicos que afectan a los cromosomas somáticos (Custer y Col. 2000), efectos inmunosupresivos (White y Col. 1985) y daños inmunológicos, (Auffret y Col. 2004) que pueden provocar una disminución de su reproducción por inhibición de la producción de hormonas sexuales (Fowler y Col. 1995). El petróleo y otros contaminantes una vez ingeridos por las aves, son absorbidos en el intestino y luego transportados hasta el hígado, donde una serie de sistemas enzimáticos los modifican estructuralmente para favorecer su eliminación.

Colonia de pingüinos de la Estancia San Lorenzo

Península Valdés, provincia de Chubut, declarada patrimonio de la humanidad por la UNESCO en 1999, es uno de los destinos turísticos más importantes del país (Fig. 3 y 4), recibiendo alrededor de 350.000 visitantes al año (Anuario Estadístico de Turismo 2014/2015, Ministerio de Turismo, Provincia del Chubut). La crisis económica del país, el bajo precio de la lana, y el desarrollo creciente de la industria turística llevó a que varios establecimientos rurales en el área vieron al ecoturismo como una fuente complementaria e incluso alternativa interesante de ingresos (Yorio y Col. 2001, Bertellotti y Col. 2015).

La estancia San Lorenzo (42°05'S, 63°49'O), localizada en el norte de Península Valdés, es un establecimiento rural que posee una colonia importante de pingüinos de Magallanes

en su costa. Además de la actividad ganadera ovina tradicional, desarrolla actividades turísticas llevando visitantes diariamente a la colonia durante la temporada reproductiva de las aves. La actividad turística se inició en el año 2000 y el número de visitas fue incrementando a lo largo de los años. Actualmente, el convenio de uso acordado con el Ministerio de Turismo de Chubut les permite recibir en los senderos de la pingüinera grupos de 30 personas con dos guías o un guía y un asistente, tal como lo establece el Programa de Turismo Responsable de la Estancia San Lorenzo (SL). Las visitas sólo se realizan en un área específica bien definida de la colonia, dicha zona está delimitada por un sendero, donde los turistas sólo pueden transitar caminando dentro de sus límites.

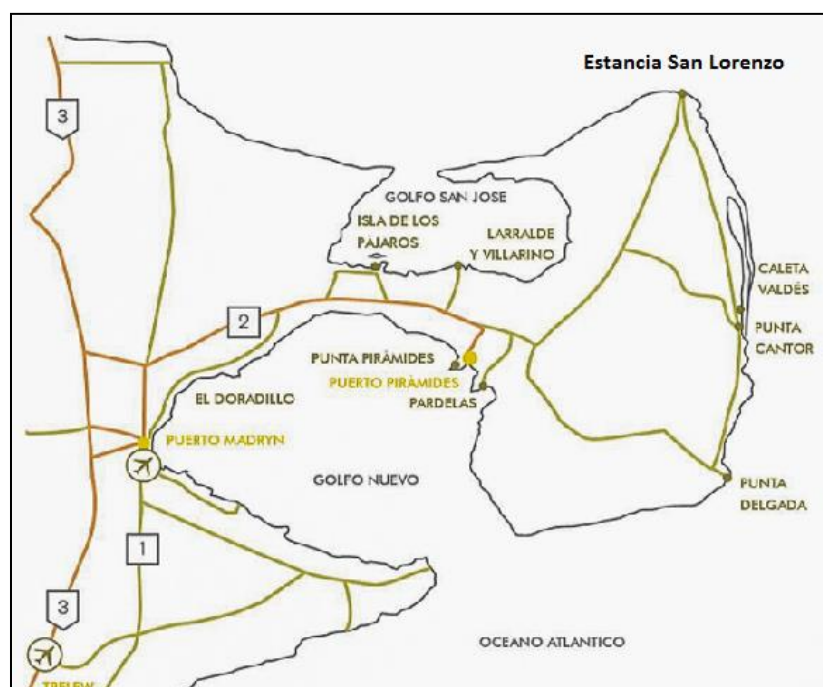


Fig. 3 Mapa de la Estancia San Lorenzo, Chubut.

Desde el año 2005 se llevan estudios con el fin de determinar si el turismo tiene efectos negativos, comparando pingüinos que anidan en zonas que reciben turismo y zonas no disturbadas (control). Para ello se estudió algunos parámetros que incluyeron éxito reproductivo (cantidad de huevos puestos, cantidad de pichones nacidos, cantidad de pichones sobrevivientes hasta las 5 semanas de vida), la hormona del estrés

(corticosterona), la frecuencia cardiaca, el crecimiento de pichones, y las respuestas comportamentales de los pingüinos.

La única diferencia que se observó fue que los pingüinos pertenecientes a las zonas no perturbadas reaccionaban frente a las personas a mayor distancia que los pingüinos que se encontraban en los senderos turísticos, demostrando que estos últimos se acostumbran a las visitas (Villanueva y Col. 2014).



Fig. 4 Fotos de la Estancia San Lorenzo.

Colonia de pingüinos en Isla Quiroga

La colonia de pingüinos de la Isla Quiroga (IQ) se encuentra en la localidad de Puerto Deseado, situada en la Ría Deseado (Fig. 5 y 6), provincia de Santa Cruz. Allí se encuentra localizada la Reserva Provincial Ría Deseado, que consta de una serie de islas sobre la ría, pertenecientes a la eco-región estepa patagónica. La colonia de la Isla Quiroga cuenta con 1500 parejas reproductivas (Frere no publicado). Esta isla está a 80 m de la costa (en bajamar 6 m de amplitud entre la baja y alta mar) y mide en su máxima longitud 600 m (oeste-este) y en su máxima amplitud 98 m (norte-sur). En la isla no existe la fauna

terrestre pero si hay gran variedad de aves que nidifican, como la gaviota cocinera (*Larus dominicanus*), el gaviotín sudamericano (*Sterna hirundinacea*), el pato crestón (*Lophonetta specularioides*), el ostrero negro (*Haematopus ater*) y el pato vapor volador (*Tachyeres Patachonicus*) (Barrionuevo 2015).

Hasta hace cuatro años, la intensidad de visitas humanas era muy baja, ya que la isla era utilizada ocasionalmente para la pesca y la recolección de huevos de gaviota cocinera. Actualmente, no se permite el desembarco en la isla, salvo sólo visitas ocasionales de investigadores (Cevasco y Col. 2001).



Fig. 5 Mapa de la Isla Quiroga, Santa Cruz (punto verde).



Fig. 6 Fotos de la Isla Quiroga

Objetivos



OBJETIVO GENERAL

Las colonias reproductivas de los pingüinos de Magallanes distribuidas a lo largo de la costa patagónica enfrentan diferentes presiones ambientales tanto naturales como producto de las actividades del desarrollo humano. Entre las naturales se encuentran las fluctuaciones en la disponibilidad de presas, eventos meteorológicos adversos y efectos denso-dependientes. En tanto que las de origen humano incluyen la captura incidental en redes de pesca, la explotación turística de sus colonias y la contaminación por hidrocarburos, entre otras. La exposición a estos escenarios de presión ambiental, puede generar en las aves alteraciones fisiológicas y producir estrés oxidativo.

El objetivo general de esta tesis fue evaluar el efecto ambiental sobre diferentes parámetros de estrés oxidativo y hematológicos, en dos poblaciones de pingüinos de Magallanes. En una de las colonias, los pingüinos se reproducen bajo presión de uso turístico (Península Valdés, San Lorenzo), mientras que en la otra, los pingüinos están expuestos a contaminantes por su cercanía al puerto y a la ciudad (Puerto Deseado, Isla Quiroga). En individuos de ambas colonias se analizaron parámetros hematológicos y de estrés oxidativo, teniendo en cuenta el sexo, la edad y la zona de anidación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En pingüinos de Magallanes que se reproducen en una colonia bajo presión de uso turístico (Península Valdés), en individuos que nidifican en los senderos turísticos, individuos que nidifican lejos de los senderos (zona control), y en individuos que se reproducen en una colonia expuesta a hidrocarburos por su cercanía a un puerto (Puerto Deseado), se propone:

- Evaluar diferentes marcadores de estrés oxidativo: actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión transferasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa), niveles de

tioles totales y de TBARS, capacidad antioxidante total y daño oxidativo por hidroperóxidos.

- Analizar parámetros hematológicos e indicadores bioquímicos: hematocrito, perfil leucocitario y relación heterófilos/linfocitos, niveles de colesterol, glucemia, proteínas totales y enzimas hepáticas (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, pseudocolinesterasa).
- Comparar los diferentes parámetros mencionados en pingüinos de ambas colonias teniendo en cuenta las distintas edades (pichones y adultos) y el sexo.

Materialles y métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se desarrolló en dos colonias de pingüinos que se encuentran distanciadas por más de 650 km y presentan diferentes presiones ambientales. La colonia ubicada en la estancia San Lorenzo (SL, 42°05'S, 63°51'O, Fig. 1) localizada en el Área Natural Protegida Península Valdés, Chubut, tiene una superficie de unas 100 hectáreas a lo largo de 4 km de costa y una población de alrededor de 60000 parejas reproductivas (Bertellotti 2013; Villanueva y Col. 2014). Esta colonia se considera en crecimiento (Pozzi y Col. 2015), en una pequeña área se desarrollan actividades turísticas desde hace alrededor de 15 años y actualmente recibe unos 12000 visitantes por año que recorren un sendero circular entre los nidos de pingüinos.

La colonia ubicada en la Isla Quiroga (IQ, 47°45'S, 65°56'O, Fig. 1), se encuentra en la Ría Deseado, Santa Cruz, declarada como Reserva Intangible Natural, tiene una superficie de 3 Ha y una población de 1500 parejas reproductoras (Barrionuevo y Frere 2015). Aunque la Isla se encuentra protegida prohibiéndose el ingreso de personas, los pingüinos están expuestos a las actividades industriales, portuarias y de pesca, afectando directa o indirectamente las especies de aves que nidifican o utilizan la Ría Deseado como área de paso (Gandini y Frere 1996). El puerto de la ciudad se encuentra muy cerca de la colonia, a tan solo 1.5 km de distancia, pudiendo así afectar la buena salud de los animales.

Toma de muestras

En cada colonia, los pingüinos fueron seleccionados al azar y capturados en sus nidos y luego se marcaron con colorante no tóxico (de repostería) para identificarlos y evitar la

recaptura. A cada individuo se le extrajo entre 1 y 3 ml de sangre de la vena radial (aleta) o tarsial (pata) con jeringas descartables heparinizadas con agujas 23G (Fig. 2). La sangre se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron en una conservadora refrigerada hasta su posterior procesamiento (hasta un máximo de 5 horas).

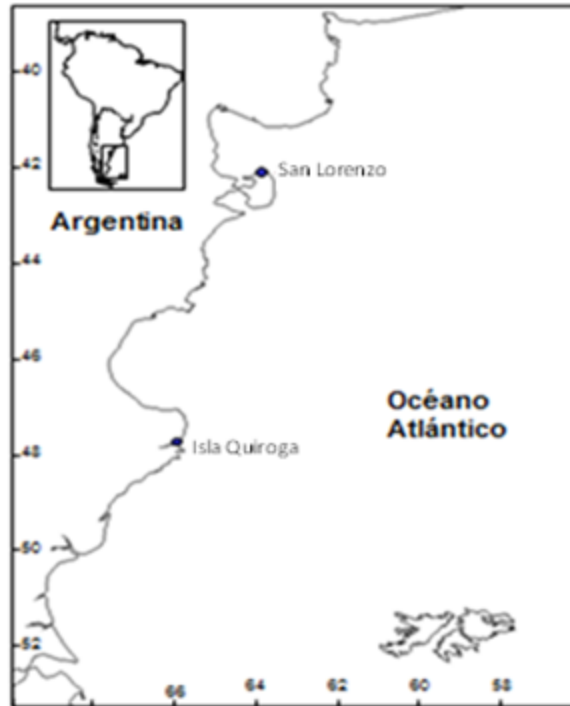


Fig. 1 Mapa, parte superior Estancia San Lorenzo (Chubut) e inferior Isla Quiroga (Santa Cruz).

Medidas morfométricas

Se tomó el peso de cada pingüino con una balanza manual (pesola), se midió el largo y alto del pico con un calibre digital (precisión 0.01 mm), datos que sirvieron para poder determinar, en los animales adultos, el sexo (Bertellotti y Col. 2002). Además, en pichones se tomó el largo de la aleta con una regla metálica (precisión 1 mm), (Fig. 3).

Análisis hematológicos

Preparación de frotis

Se prepararon frotis sanguíneos con una gota de sangre fresca, se fijaron con alcohol etílico 96% v/v y se colorearon con Tinción 15 (Biopur). Bajo microscopio óptico se estimó la cantidad total de leucocitos (LT) en 10 campos visuales con una densidad homogénea de células a 400x (Hale y Briskie 2007). Se diferenciaron y se contaron los tipos celulares (basófilos, eosinófilos, heterófilos, linfocitos y monocitos) hasta llegar a los 100 leucocitos, en 1000x con aceite de inmersión (Campbell 1995). De este conteo se obtuvo la razón heterófilos/linfocitos (H/L), conocido como un indicador de estrés fisiológico (Davis y Col. 2008).

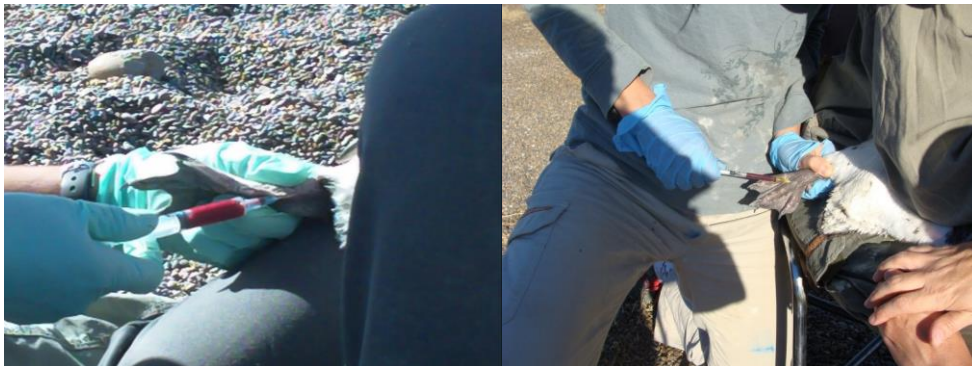


Fig. 2 Toma de muestra de sangre.



Fig. 3 Medidas morfométricas: peso, largo del pico y largo del ala.

Evaluación de hematocrito, glucosa y proteínas totales

Se midió el hematocrito (porcentaje de glóbulos rojos en el volumen total de sangre) a partir de la centrifugación de microcapilares heparinizados a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo el valor de glucosa en sangre mediante el uso de tiras reactivas usando el dispositivo Accu-Chek Performa de Roche. El resto de la sangre colectada se centrifugó a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 15 minutos para separar el plasma de la fracción celular. La concentración de proteínas totales plasmáticas (PT) se obtuvo con un refractómetro veterinario (ZGRC-200, Científica Schönfeld).

Determinación de enzimas hepáticas

Se enviaron aproximadamente 200 μ l de plasma al Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires. Allí se determinó la concentración de diferentes enzimas: aspartato aminotransferasa (UI/L), alanina aminotransferasa (UI/L) y fosfatasa alcalina (UI/L) utilizando el método de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) (Hernández Betancourt Y Col. 2012). La lactato deshidrogenasa (UI/L) por el método DGKC, donde dichas concentraciones están optimizadas de acuerdo a la Sociedad Alemana de Química Clínica (DGKC). Y la pseudocolinesterasa (UI/L) por el método Schmidt.

Análisis del colesterol

Se midió el colesterol (mg/dl) por el método enzimático en el Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas "José de San Martín". No fue necesario realizar ninguna modificación a las técnicas. Esta determinación fue corroborada mediante otra metodología, usando tiras reactivas. Resultados comparables fueron obtenidos (resultados no mostrados).

Parámetros de estrés oxidativo

El análisis de las enzimas catalasa, glutatión reductasa y la evaluación de los niveles de tioles totales no proteicos y TBARS se realizó en glóbulos rojos. Se lavó el paquete globular de cada muestra (1 ml) tres veces con solución fisiológica (5 ml), centrifugando las muestras durante 15 min a 3000 rpm, a temperatura ambiente. Una vez terminado el lavado, se colocó 1 ml paquete globular en tubos eppendorf que contenían 100 μ L de ácido acético 1 μ M de sulfato de magnesio ($MgSO_4$). De esta forma se conservaron en el freezer a $-20^{\circ}C$.

Luego antes de cada técnica se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente, se tomó el sobrenadante para realizar las determinaciones. La metodología fue descrita anteriormente por Llesy y Col. 2012, realizándose algunas modificaciones.

Como controles positivos se utilizaron extractos proteicos de hígado de rata. Los blancos se prepararon reemplazando la muestra por el tampón de reacción. Se analizó la actividad de la enzima catalasa midiendo la velocidad de descomposición de H_2O_2 a 240 nm por espectrofotometría, según Chance 1954, con algunas modificaciones. La mezcla de reacción se llevó a cabo tampón fosfato 50 mM, pH 7.2, cada 100 ml de tampón fosfato se agregaban 180 μ l de H_2O_2 (Merck, Argentina) y 5 μ l de muestra. Los resultados se normalizaron de acuerdo al contenido de proteínas determinado por el ensayo Bradford (Bradford 1976). Una unidad de catalasa se definió como la desaparición de 1 μ mol de

H_2O_2 /minuto (ϵ 43.6 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los blancos de reacción se prepararon reemplazando la muestra por el tampón de reacción.

Análisis de la actividad de la glutatión reductasa

La glutatión reductasa es NADPH dependiente y regenera glutatión reducido (GSH) a partir de glutatión oxidado (GSSG) (Racker 1955). En una cubeta se colocó 420 ml de buffer fosfato Tris 100 mM, EDTA 10 mM pH 8 con la muestra de glóbulos rojos (25 μl), se le agregó 5 μl de NADPH 10 mM y 50 μl GSSG 25 mM. Se midió el decaimiento de la absorbancia a 340 nm ($\epsilon=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad se expresó en nmoles de GSH/min.mg de proteína.

Análisis de la actividad de la glutatión-S-transferasa

Se determinó la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa, se utilizó el reactivo 1-cloro-2,4 dinitrobenzoceno (CDNB), el cual en presencia de glutatión forma GS-dinitrobenzoceno, absorbe a una longitud de onda de 340 nm, método descrito por Habig y Col. 1974, con algunas modificaciones. Se colocó en un tubo eppendorf, 1 ml de buffer fosfato (pH 6.5), 120 μl de glutatión reducido 10 mM (preparado en el momento) y 20 μl de plasma. Se llevó la absorbancia a cero con el blanco de reacción, luego se agregó 20 μl de CDNB y se evaluó la absorbancia a 340 nm durante un minuto ($\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se expresaron los resultados como $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{ml}$.

Evaluación de los tioles totales no proteicos

Se determinó la concentración de los tioles totales no protéicos mediante la evaluación de la capacidad de los grupos tioles (-SH) de reducir el ácido 5-5'ditiobis-nitrobenzóico (DTNB), tanto en plasma como en glóbulos rojos. El plasma (1 μl) y los glóbulos rojos (1 μl) se homogeneizaron con 1 ml HClO_4 , luego se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm y se

neutralizó con Na_3PO_4 (0.44 M) hasta obtener un pH 7. Previamente se agregó 50 μl DTNB 6 mM en NaHCO_3 0.5% (p/v). Se registró la absorbancia a 412 nm luego de 30 segundos (ϵ 13.6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como mmol/L de tioles totales para el plasma y mmoles/mg de proteínas para los glóbulos rojos, el método que se utilizó en el presente estudio fue descrito con anterioridad por Tietze y colaboradores (1969).

Evaluación de la peroxidación lipídica

Se analizó la peroxidación lipídica en plasma y en glóbulos rojos, determinando el malondialdehído (MDA) y otros aldehídos al reaccionar con dos moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), bajo condiciones de acidez y temperatura controladas a 100°C, formando un cromógeno rojo (MDA-TBA), el procedimiento se llevó a cabo según Yagi (1976), con algunas modificaciones. Las muestras de plasma (200 μl) se diluyeron previamente con la mezcla de reacción que contenía ácido tricloro acético 20% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0.7% (p/v) y HCl 4N. La mezcla se hirvió por una hora y luego se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos.

En cambio, para la muestra de glóbulos rojos se diluyó primero con tampón fosfato 50 mM pH 7.4 (Hernández-Muñoz y Col. 1984). Luego se agregó la muestra (5 μl) a la mezcla de reacción que contenía ácido tricloro acético 20% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0.7% (p/v) y HCl 4N, del mismo modo que para la plasma, la mezcla se hirvió por una hora y luego se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos. En ambos casos se midió la absorbancia del sobrenadante rosado correspondiente a las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 535 nm ($\epsilon=1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Como blanco se utilizó la mezcla de reacción hervida por una hora y centrifugada a 3000 rpm en ausencia de muestra para el plasma, a diferencia que la del paquete globular contenía además tampón fosfato 50 mM. Los resultados se expresaron como μM de TBARS para plasma y nmoles/mg de proteínas de TBARS para glóbulos rojos.

Análisis de la actividad de superóxido dismutasa

Se determinó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en glóbulos rojos. Esta enzima cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. La actividad se puede determinar gracias a su habilidad de inhibir la auto-oxidación de la epinefrina a pH alcalino. El anión superóxido es un intermediario de dicha reacción (Misra y Fridovich 1972). Para ello se tomó 1 ml de tampón glicina 50 mM pH 10.2 y se colocó en una cubeta en el espectrofotómetro, llevando la absorbancia a cero. Luego se agregó 17.5 μ l de epinefrina 60 mM pH 2, determinándose la aparición de epinocromo a 480 nm. Se tomó la pendiente de ese gráfico (a). Luego se realizó el mismo procedimiento pero agregando al menos 3 volúmenes distintos de muestra (8, 15 y 25 μ l). Se efectuó la lectura para dichos volúmenes y se tomó la pendiente (b). Se calculó b/a para cada volumen de muestra. Posteriormente se graficó el log de b/a =f (μ l de muestra agregado). Unidad de SOD (U SOD) corresponde a los μ l de muestra que inhiben en un 50 % la velocidad de formación de epinocromo. No se detectó actividad de la SOD para las muestras de pingüino, a través de este método.

Evaluación del test de metabolitos del oxígeno reactivo (d-ROM) y la prueba de oxy-adsorbent

Se evaluó el balance oxidativo en el plasma sanguíneo vía los componentes oxidantes y antioxidantes, utilizando el test de metabolitos del oxígeno reactivo (d-ROM) y la prueba de oxy-adsorbent (Diacron Internacional, Grosseto, Italia), respectivamente. Las técnicas fueron descritas por Beaulieu y Col. 2010, realizándose pequeñas modificaciones. Estas determinaciones se plasmaron en colaboración con el Departamento de Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias (CSIC, Madrid, España).

La prueba d-ROMs, mide hidroperóxidos plasmáticos, un metabolito del oxígeno reactivo, que resulta del daño oxidativo (ataque de ROS en sustratos orgánicos tales como aminoácidos, proteínas, nucleótidos, etc.). Mientras que la prueba de oxy-adsorbents mide la capacidad total de antioxidantes (OXY), cuantificando la contribución de los

antioxidantes tanto exógenos como los sintetizados endógenamente por la adición de un oxidante muy potente, ácido hipocloroso (HClO). El radicales HClO sin reaccionar se pueden medir fotométricamente debido a que reaccionan con un sustrato cromogénico (Beaulieu y Col. 2010), con modificaciones menores, tales como el uso de vortex (15 seg.), y la incubación con agitación (nivel 6 de 10) en una Amersham Bioscience Hibridación horno/agitador que permite una mejor homogeneización. Se leyó la absorbancia de la microplaca con un espectrofotómetro a 37°C y agitación (nivel medio) por un minuto a una longitud de onda de 490 nm (Multi-Mode Lector de microplacas, Synergy TM HT, BioTek). Las mediciones se expresaron como mg de H₂O₂/dl y mmol de HClO/ml de muestra para las pruebas de d-ROMs y oxy-adsorbents, respectivamente.

Análisis estadísticos

El análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5 (CA, EE.UU.). Las evaluaciones se efectuaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls o por Test de Student según corresponda.

Se determinó la posible asociación entre los diferentes parámetros, se analizaron los coeficientes de correlación rho de Spearman y el nivel de significación (dos colas).

Se consideró estadísticamente significativo un $P \leq 0.05$ (dos colas).

Consideraciones éticas

Atendiendo a la responsabilidad ética y social que compete a la actividad científica y tecnológica, este estudio no comprometió ni afectó los derechos humanos, ni fue causa de un eventual daño al medio ambiente, a los animales y/o a las generaciones futuras. El

estudio obtuvo los permisos otorgados por las autoridades de aplicación de la provincia de Chubut y Santa Cruz (Dirección de Fauna y Flora Silvestre, Subsecretaria de Recursos Naturales, Ministerio de Desarrollo Territorial y Sectores Productivos, y Subsecretaría de Conservación y Áreas Protegidas, Secretaría de Turismo). Este trabajo además fue acorde con todos los requisitos éticos, legales y jurídicos, establecidos en las normas bioéticas nacionales (Disposición ANMAT 5330/97) e internacionales (Código de Núremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO, del 11/11/1997).

Evaluación del tiempo de manipulación en parámetros de estrés oxidativo

En la colonia de San Lorenzo y en la de Isla Quiroga, se comprobó que no hubiera modificaciones en algunos parámetros de estrés oxidativo a lo largo del tiempo de manipulación del animal (desde su captura hasta finalizar la toma de sangre). El mayor tiempo de manipulación de los animales en la Estancia San Lorenzo fue de 18 minutos, mientras que en la Isla Quiroga fue de 39 minutos.

Como se muestra en la Fig. 4 y 5, la media de los diferentes parámetros evaluados, se mantuvo a lo largo del tiempo de manipulación.

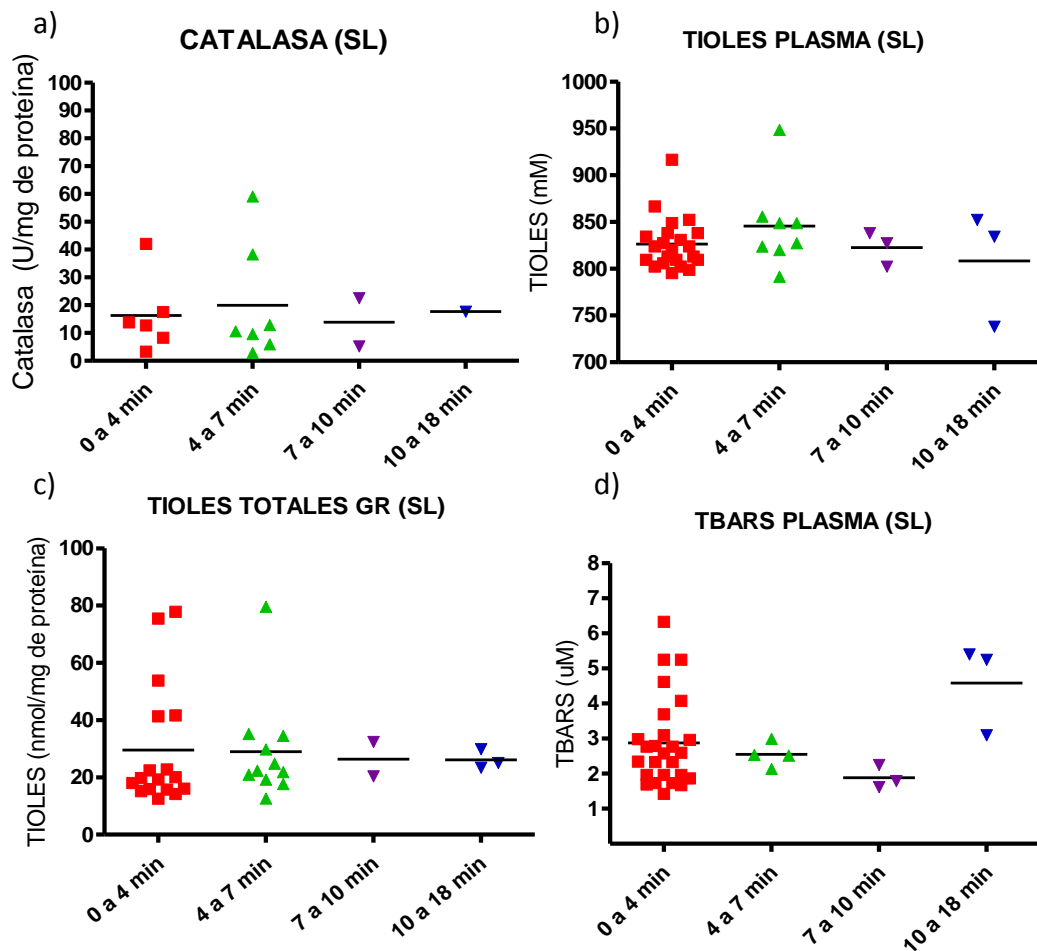


Fig. 4 Evaluación del tiempo de manipulación en animales que anidan en San Lorenzo (SL): a) Actividad de la catalasa (U/mg de proteína), b) Tioles en plasma (mM), c) Tioles en glóbulos rojos (nmol/mg de proteína), d) TBARS en plasma (μ M).

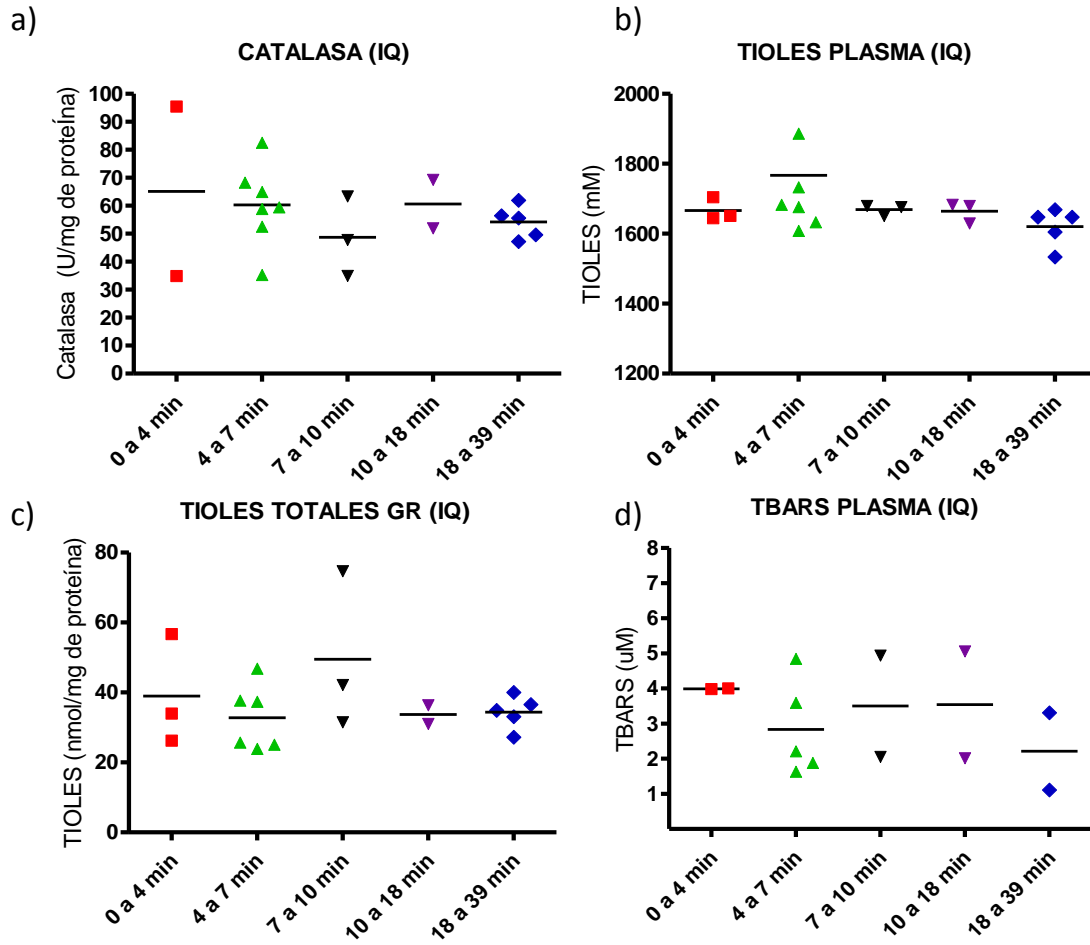


Fig. 5 Evaluación del tiempo de manipulación en animales que anidan en la Isla Quiroga (IQ) a) Actividad de la catalasa (U/mg de proteína), b) Tioles en plasma (mM), c) Tioles en glóbulos rojos (nmol/mg de proteína), d) TBARS en plasma (μ M).

Resultados 1

Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes de la colonia San Lorenzo, Chubut

RESULTADOS 1

1.1 PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEMATOLÓGICOS EN PINGÜINOS DE MAGALLANES QUE ANIDAN EN LA ESTANCIA SAN LORENZO

Los efectos de las actividades humanas pueden tener consecuencias negativas sobre los animales (Götmark 1992, Villanueva 2012). Algunos estudios revelan que el turismo puede producir cambios fisiológicos, afectando la supervivencia de los animales silvestres (Semeniuk y Col. 2009; Knapp y Col. 2013). Los pingüinos son potencialmente vulnerables a los disturbios humanos, incluso si estos disturbios ocurren con buenas intenciones como el ecoturismo o el trabajo científico.

Hasta el momento, son muy pocos los estudios que evalúan el efecto de factores antropogénicos sobre parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos.

El objetivo principal de esta primera parte, fue evaluar el posible impacto del turismo, analizando parámetros de estrés oxidativo y hematológicos en pingüinos de Magallanes de la colonia de la Estancia San Lorenzo (SL) que anidan en una zona control (sin turistas) y en una zona expuesta al turismo, de ahora en más zona sendero. Asimismo, el estudio de estos parámetros en sangre de los animales, teniendo en cuenta el sexo y edad, permitirá establecer bases de datos de referencia, para posteriores trabajos comparativos, con el fin de identificar y cuantificar los impactos ambientales.

1.2 Parámetros hematológicos de pingüinos de Magallanes que anidan en zona control y zona sendero, en la Estancia San Lorenzo

Se presta especial atención a los parámetros hematológicos (hematocrito, proteínas totales, glucemia, etc.) ya que pueden actuar como sensibles señales de alerta temprana de los posibles efectos antropogénicos en la salud y el estado fisiológico de los animales.

En la Fig. 1.1 a, se muestran los resultados de los niveles de glucosa (mg/dl) en sangre entera de los animales, no encontrándose diferencias significativas para los valores del grupo de animales de la zona control (160.6 ± 4.7 , $n=27$) y de la zona sendero (156.0 ± 4.4 , $n=27$).

También se determinaron los niveles de proteínas totales (g/dl) (6.2 ± 0.2 , $n=27$ vs. 6.1 ± 0.19 , $n=27$) y el hematocrito (%) (36.2 ± 2.6 , $n=27$ vs. 29.6 ± 2.1 , $n=27$), no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos de animales (Fig. 1.1 b y 1.1 c).

Los valores promedio para el colesterol (mg/dl) fueron 291.8 ± 23.2 ($n=13$) en zona control y 238.7 ± 14.4 ($n=6$) en zona sendero (Fig. 1.2 a).

La determinación de enzimas hepáticas puede ser un indicador de disfunción o daño hepático. De esta manera, se determinaron los niveles de la enzima alanina aminotransferasa (UI/L), cuyos valores promedio fueron para la zona control 33.3 ± 4.8 ($n=9$) y para zona sendero 29.1 ± 5.9 ($n=7$), (Fig. 1.2 b).

Los valores promedio para la enzima aspartato aminotransferasa (UI/L) fueron para zona control 193.4 ± 4.8 ($n=9$) y zona sendero 187.9 ± 23.7 ($n=7$), (Fig. 1.2 c).

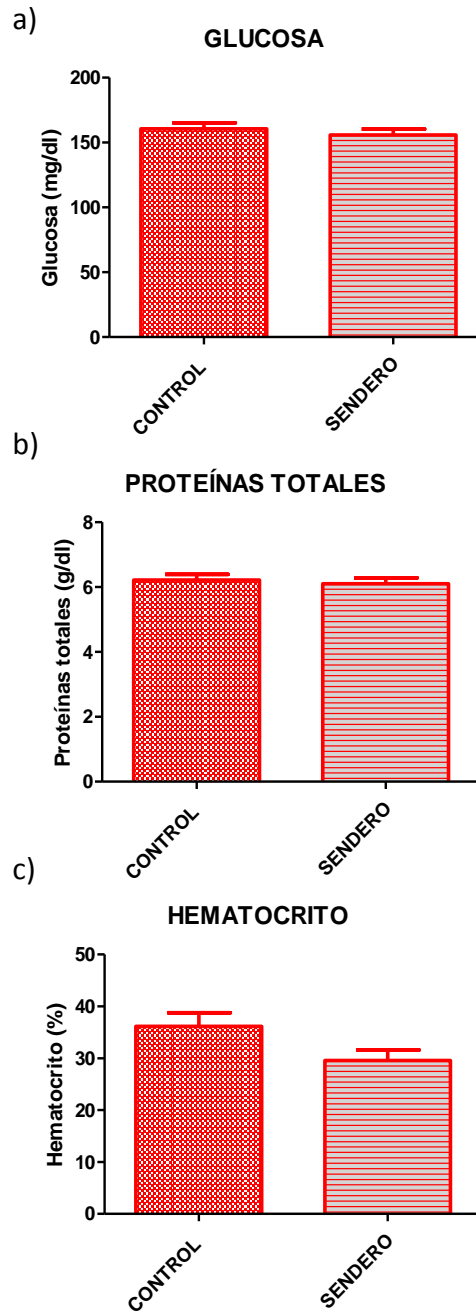


Fig. 1.1 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Glucemia (mg/dl), b) Proteínas totales (g/dl), c) Hematocrito (%). T-test ($P > 0.05$).

En la Fig.1.3 b, se muestra el análisis de la enzima lactato deshidrogenasa (UI/L), cuyos valores promedios fueron en la zona control 542.0 ± 87.8 (n=7) y en la zona sendero 632.8 ± 55.9 (n=8).

Por último, se evaluó la enzima pseudocolinesterasa (UI/L), con valores promedio para la zona control de 5541 ± 1024 (n=7) y para la zona sendero de 4066 ± 843 (n=7), (Fig. 1.3 c).

En ninguno de estos casos se encontraron diferencias significativas entre las zonas.

El uso de frotis sanguíneos es una técnica útil para estudiar los efectos en la inmunosupresión provocada por el impacto ambiental. Una variable confiable que permite medir la respuesta al estrés en las aves es la relación heterófilos/linfocitos (H/L) (Gross y Siegel 1983). Los valores promedio fueron para el grupo control 1.2 ± 0.1 (n=42) y para la zona sendero 1.2 ± 0.1 (n=41), (Fig. 1.4 a).

En la Fig. 1.4 b, se muestran las medias de los leucocitos totales que fueron 53.4 ± 3.1 (n=42) y 54.7 ± 2.8 (n=41) para los individuos que anidan en zona control y en zona sendero, respectivamente.

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos análisis.

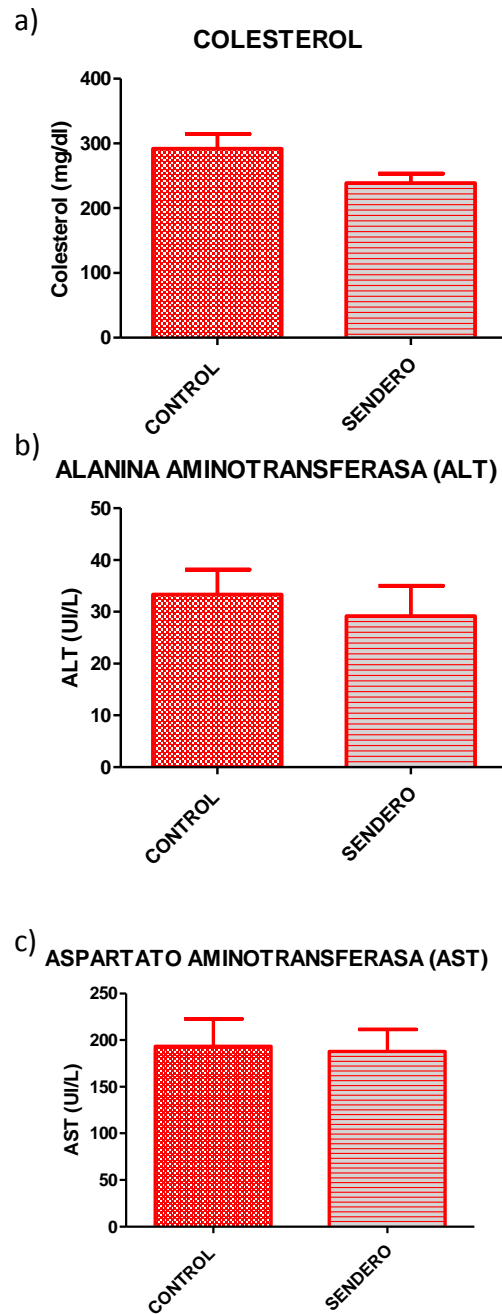


Fig. 1.2 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Colesterol (mg/dl), b) Alanina aminotransferasa (ALT) (UI/L), c) Aspartato aminotransferasa (AST) (UI/L). T-test ($P < 0.05$).

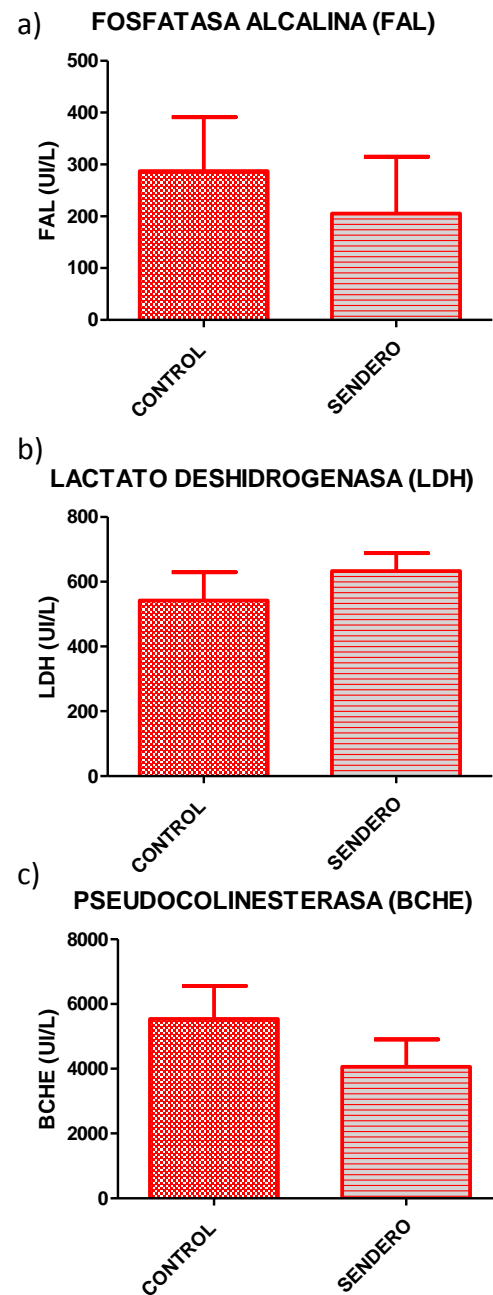


Fig. 1.3 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Fosfatasa alcalina (FAL) (UI/L), b) Lactato deshidrogenasa (LDH) (UI/L), c) Pseudocolinesterasa (BCHE) (UI/L). T-test ($P > 0.05$).

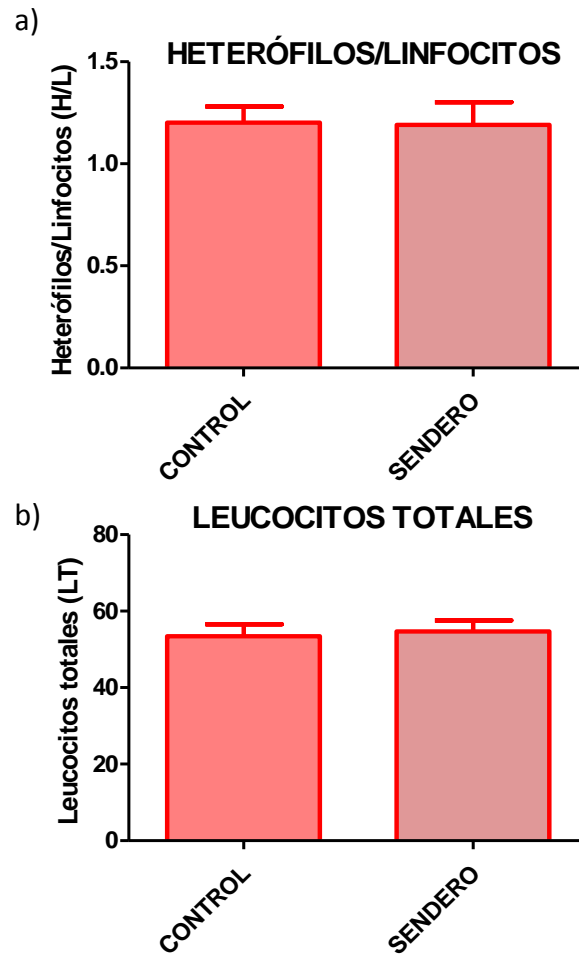


Fig. 1.4 Resultados de los parámetros hematológicos: a) H/L, b) Leucocitos totales. T-test (P>0.05).

1.3 Parámetros de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes que anidan en zona control y zona sendero en la Estancia San Lorenzo

Para la evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma, se realizó la técnica de OXY-adsorbente, mientras que la prueba d-ROM se utilizó para evaluar el ataque de ERO sobre sustratos orgánicos (Beaulieu y Col. 2010).

En la Fig. 1.5 a, se muestran los niveles de OXY ($\text{mmol}^{-1}\text{HOCl}$ neutralizado) en plasma, cuyos valores promedio fueron para la zona control 255.3 ± 7.1 ($n=23$) y para la zona sendero 264.9 ± 6.5 ($n=28$). No se encontraron diferencias significativas.

Los valores promedio de la prueba d-ROM ($\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dl}$) se muestran en la Fig. 1.5 b, siendo en la zona control 13.4 ± 1.4 ($n=23$) y en la zona sendero 18.0 ± 1.5 ($n=28$), (Fig. 1.5 b).

Para complementar estos análisis, se determinaron otros parámetros utilizados para el estudio de estrés oxidativo.

Se determinaron los niveles de TBARS en plasma (μM) (Fig. 1.6 a), siendo el valor promedio para la zona control de 3.4 ± 0.4 ($n=21$) y para la zona sendero 2.6 ± 0.3 ($n=18$). No se observaron diferencias significativas.

Los niveles de TBARS en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteínas), fueron para la zona control 1.2 ± 0.1 ($n=14$) y 0.9 ± 0.1 ($n=16$) para la zona sendero, no observándose diferencias significativas, (Fig. 1.6 b).

También se evaluaron los tioles totales no proteicos que juegan un papel importante en la defensa contra las ERO (Costantini y Bonadonna 2009).

En la Fig. 1.6 c, se representaron los tioles totales no proteicos en plasma (mM). Los valores promedio para la zona control fueron 32.7 ± 3.6 ($n=11$) y para la zona sendero 37.6 ± 2.6 ($n=16$), no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos.

Además, se determinaron los tioles totales no proteicos en glóbulos rojos ($\mu\text{moles/mg}$ de proteína), siendo los valores promedio para la zona control 11.6 ± 2.2 ($n=14$) y para la zona sendero 3.6 ± 0.9 ($n=5$). Se encontraron diferencias significativas.

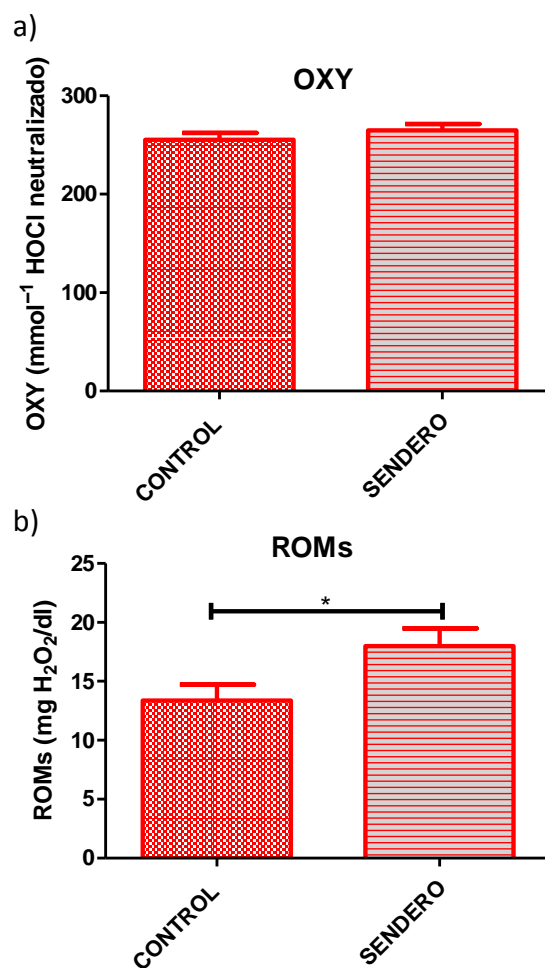


Fig. 1.5 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) OXY ($\text{mmol}^{-1}\text{HOCl}$ n), b) ROMs ($\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dl}$). T-test (**P= 0.00286).

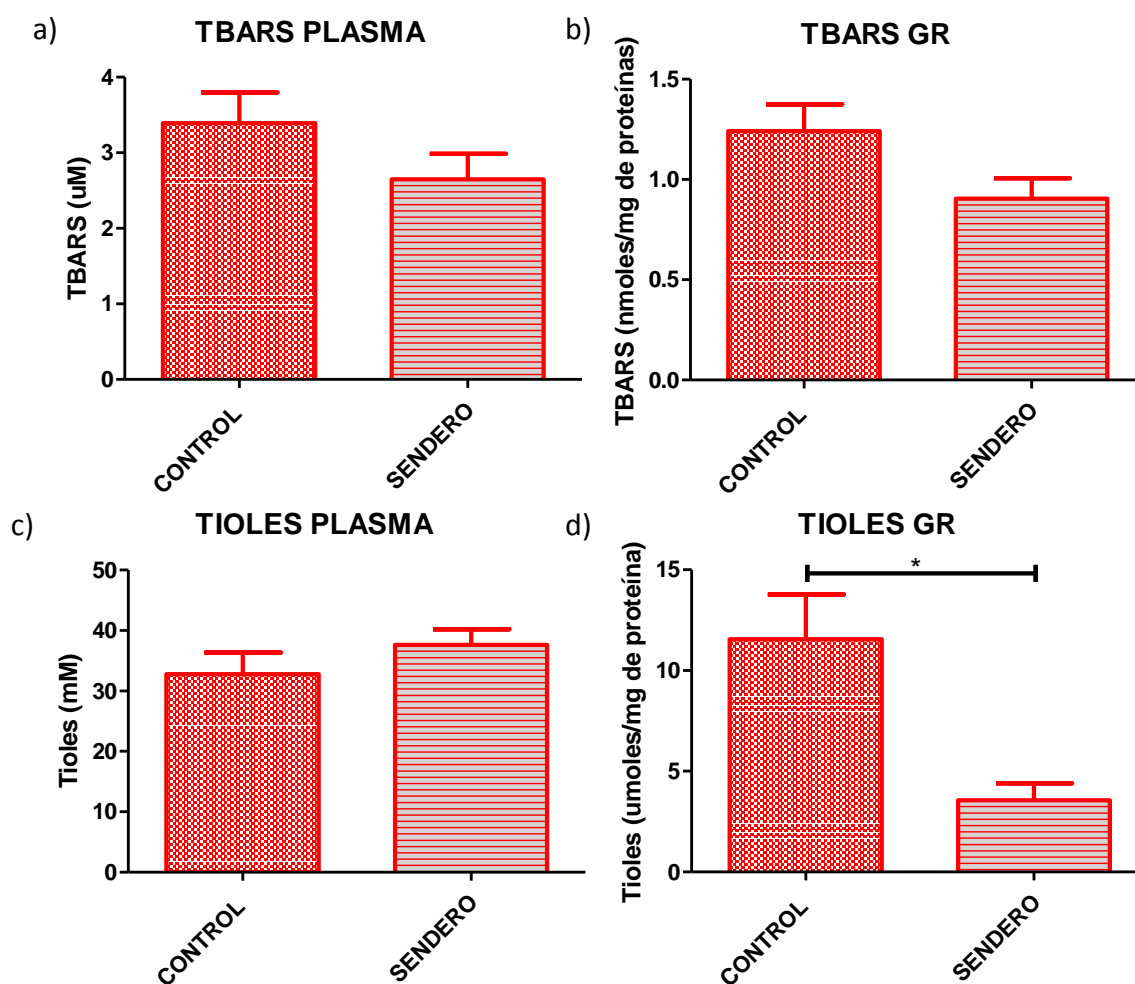


Fig. 1.6 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) TBARS en plasma (μM), b) TBARS en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteínas), c) Tioles totales no proteicos en plasma (mM), d) Tioles totales no proteicos en glóbulos rojos ($\mu\text{moles/mg}$ de proteína). T-test (* $P < 0.05$).

Se evaluaron algunas de las enzimas que actúan como antioxidantes. En la Fig.1.7 a, se muestran los niveles de la glutatión transferasa en plasma ($\mu\text{mol/min.ml}$), siendo los valores promedio correspondientes a la zona control de 0.012 ± 0.003 ($n=10$) y a la zona sendero de 0.022 ± 0.005 , ($n=12$). No se encontraron diferencias significativas.

Se evaluó la actividad de la catalasa en glóbulos rojos (U/mg de proteína) y los valores promedio de la misma fueron para la zona control 20.2 ± 3.0 (n=19) y para la zona sendero 31.0 ± 2.7 (n= 18), (Fig. 1.7 b).

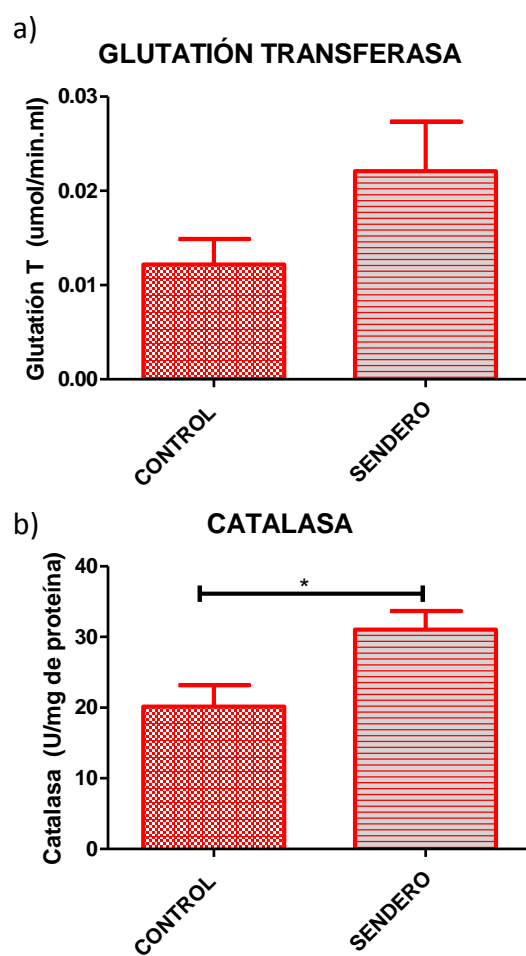


Fig. 1.7 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) Glutathion transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min.ml}$), b) Actividad de la catalasa (U/mg de proteína). T-test (* $P < 0.05$).

1.4 Parámetros hematológicos de pingüinos de Magallanes que anidan en la colonia de la Estancia San Lorenzo en función del sexo y la edad

Se determinaron los niveles de glucemia (mg/dl) y los valores promedio fueron de 145.4 ± 3.1 (n= 21) para los machos; 140.4 ± 3.7 (n=11) para las hembras y 179.5 ± 3.9 (n=22) para los pichones, (Fig. 1.8 a). También se analizaron las proteínas totales (g/dl) (Fig. 1.8 b), los valores medios para los machos fueron 6.6 ± 0.1 (n=21); para las hembras 7.2 ± 0.2 (n=11) y para los pichones 5.2 ± 0.1 (n=22). La Fig. 1.8 muestra los resultados del hematocrito (%), siendo el valor promedio del mismo para los machos 38.8 ± 1.9 (n=21); para las hembras 44.2 ± 1.8 (n=11) y para los pichones 21.6 ± 1.9 (n=22). Para los tres parámetros analizados, se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En la Fig. 1.9 a, se muestran los valores promedio de la concentración de colesterol (mg/dl) para los machos (252.9 ± 14.4 , n=10) y para las hembras (211.0 ± 4.6 , n=3). Los pichones mostraron valores significativamente mayores comparados con estos grupos (343.8 ± 35.2 , n=6).

Los valores promedio para la enzima alanina aminotransferasa (U/L) fueron 26.8 ± 4.5 (n=8) para los machos, 48.0 ± 5.0 (n=2) para las hembras y 32.3 ± 6.5 (n=6) para los pichones. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales, (Fig. 1.9 b). En la Fig. 1.9 c, se muestran los valores de aspartato aminotransferasa (U/L), cuya determinación adquiere importancia diagnóstica cuando sus valores se comparan con los de otras enzimas de similar origen tisular, como la aspartato aminotransferasa y la lactato deshidrogenasa, permitiendo completar el perfil enzimático de órganos tales como corazón e hígado (Bergmeyer y Col. 1976). Los valores fueron 201.0 ± 19.8 (n=8) para los machos; 314.5 ± 81.5 (n=2) para las hembras y 136.5 ± 6.9 (n=6) para los pichones. Se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos.

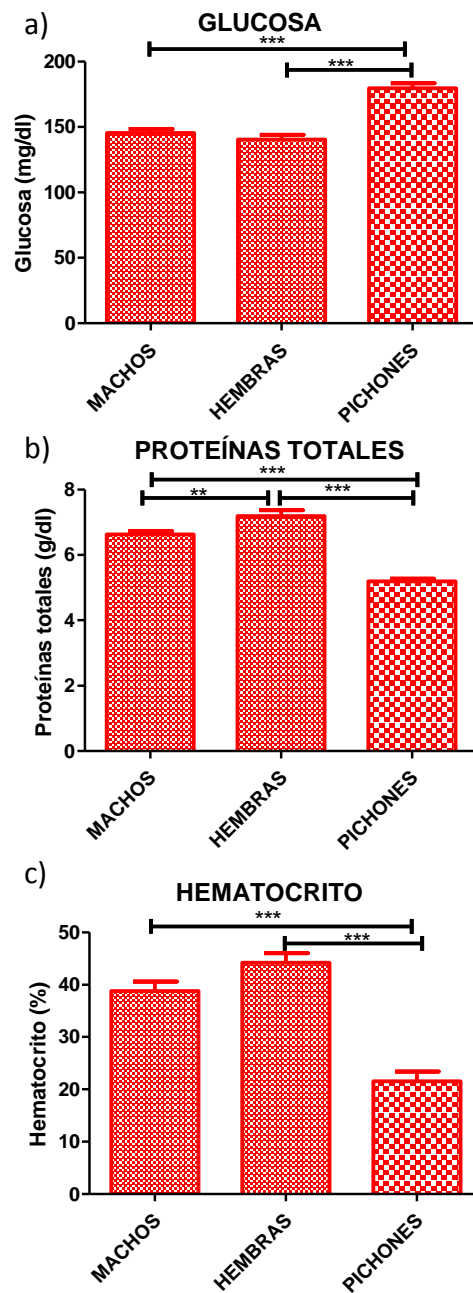


Fig. 1.8 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Glucosa (mg/dl), b) Proteínas totales (g/dl), c) Hematocrito (%). Anova y post-test de Newman-Keuls (P<0.01, ***P<0.001).**

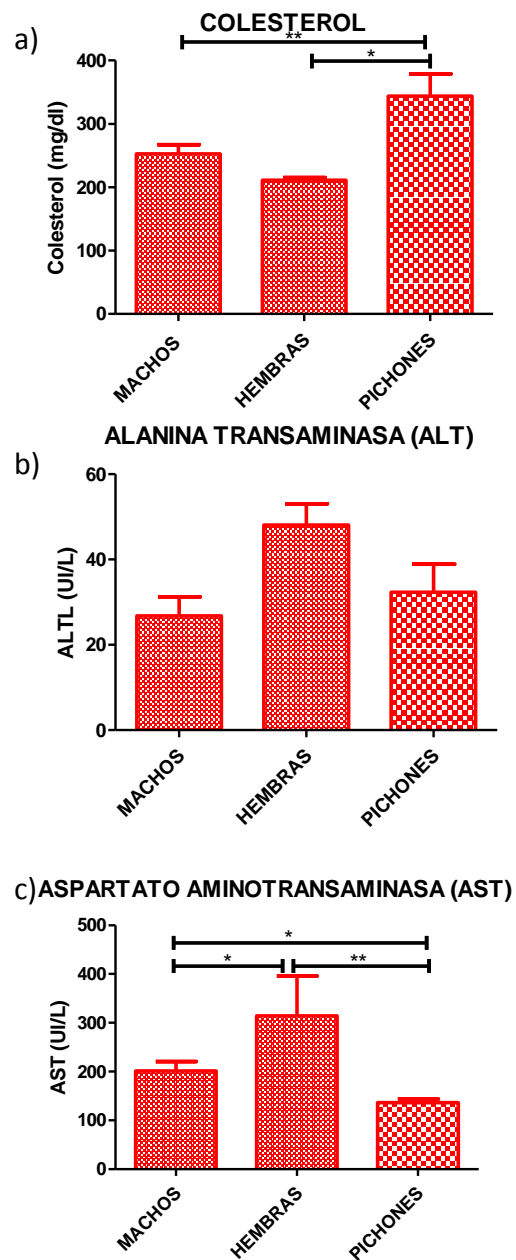


Fig. 1.9 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Colesterol (mg/dl), b) Alanina aminotransferasa (UI/L), c) Aspartato aminotransferasa (UI/L). Anova y post-test de Newman-Keuls (*P<0.05, **P<0.01).

Asimismo, se evaluó la enzima fosfatasa alcalina (UI/L), (Fig. 1.10 a). Los valores promedio para los machos fue de 38.5 ± 3.5 (n=8), para las hembras de 34.0 ± 6.0 (n=2) y se observó un valor significativamente mayor para los pichones 607.8 ± 54.2 (n=6).

En la Fig. 1.10 b se muestran los valores de la enzima lactato deshidrogenasa (UI/L), siendo los valores promedio de la misma 529.0 ± 73.4 (n=7) para los machos, 525.0 ± 133.0 (n=2) para las hembras y 683.8 ± 77.7 (n=6) para los pichones. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales.

Por último, se calcularon los niveles de la enzima pseudocolinesterasa (UI/L) Los valores promedio fueron 3381 ± 328.9 (n=7) para el grupo de los machos, 2153 ± 303 (n=2) para las hembras y fue significativamente mayor para los pichones (7856 ± 314 , n=5), (Fig. 1.10 c).

Para completar los estudios hematológicos, se analizó la relación H/L, como indicador fisiológico de estrés, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos. La media para el grupo de los machos fue de 1.1 ± 0.2 (n=13), para las hembras de 1.1 ± 0.1 (n=14) y para los pichones de 1.3 ± 0.1 (n=55), (Fig. 1.11 a). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los leucocitos totales, siendo las medias de 59.5 ± 3.1 (n=13); 73.4 ± 5.7 (n=14) y 47.9 ± 2.2 (n=56), para machos, hembras y pichones respectivamente (Fig. 1.11 b). En la tabla 1 se muestran los porcentajes de leucocitos, no encontrándose diferencias en los distintos grupos.

Tabla 1.1: Formula leucocitaria en pingüinos de Magallanes adultos y pichones.

Individuo	Colonia	Basofilos (%)	Eosinofilos (%)	Heterofilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)
Machos (n=22)	SL	1.2 ± 0.3	12.0 ± 1.3	39.2 ± 3.4	41.9 ± 3.4	5.8 ± 0.6
Hembras (n=10)	SL	1.5 ± 0.4	15.0 ± 1.1	37.9 ± 2.9	39.1 ± 2.3	6.5 ± 0.9
Pichones (n=27)	SL	0.2 ± 0.1	3.0 ± 0.3	49.3 ± 1.4	43.7 ± 1.3	3.7 ± 0.3

Los resultados informan la media \pm ESM del porcentaje de los diferentes leucocitos. (n= número de muestra).

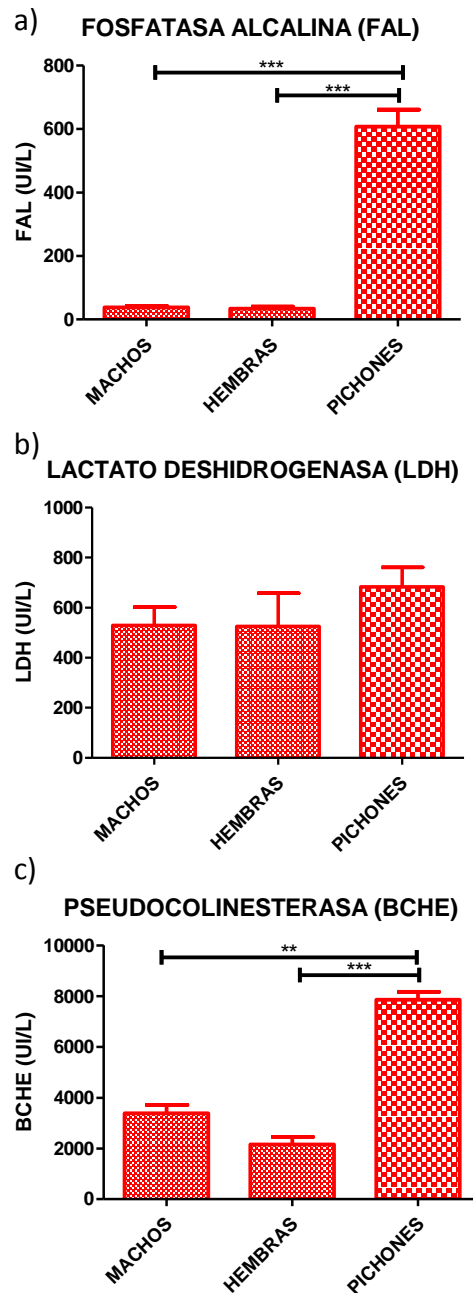


Fig. 1.10 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Fosfatasa alcalina (UI/L), b) Lactato deshidrogenasa (UI/L), c) Pseudocolinesterasa (UI/L). Anova y post-test de Newman-Keuls (*P<0.05, **P<0.01).

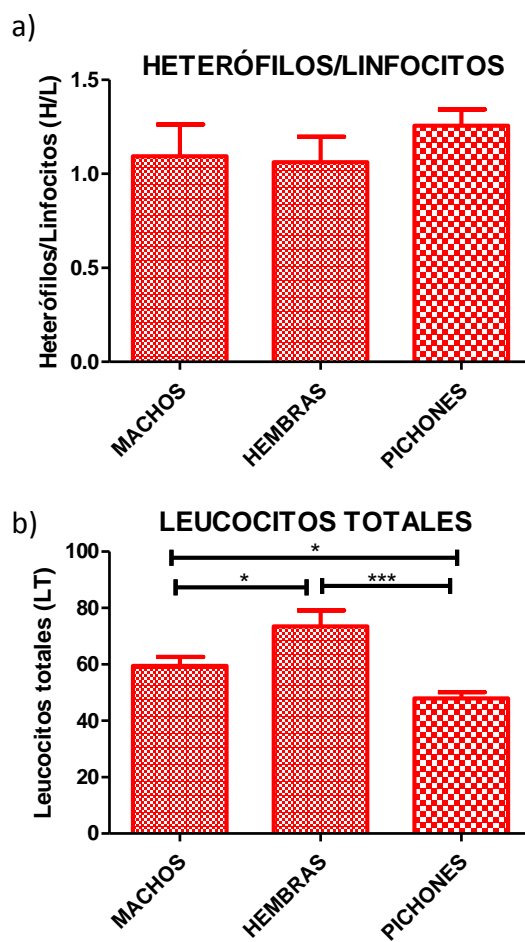


Fig. 1.11 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Razón H/L, b) Leucocitos totales. Anova y post-test de Newman-Keuls (* $P < 0.05$, * $P < 0.001$).**

1.5 Parámetros de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes que anidan en la colonia de la Estancia San Lorenzo en función de sexo y edad

Los valores promedio de OXY ($\text{mmol}^{-1}\text{HOCl}$ neutralizado), (Fig. 1.12 a) para los machos fueron de 265.9 ± 6.3 ($n=21$) y para las hembras de 281.8 ± 9.9 ($n=11$). Los pichones mostraron niveles significativamente menores de este parámetro (242.4 ± 7.6 , $n=19$).

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ROMs (Fig. 1.12 b). Los valores promedio fueron de 16.0 ± 1.3 ($n=21$) para los machos, 14.4 ± 1.7 ($n=11$) para las hembras y 16.7 ± 2.3 , ($n=11$) para los pichones.

Se evaluaron los niveles de TBARS en plasma (μM), registrándose los valores promedio para los machos que anidan en la estancia SL de 2.2 ± 0.1 ($n=17$), para las hembras de 2.3 ± 0.1 ($n=8$) y para los pichones de 3.9 ± 0.5 , ($n=11$), (Fig. 1.13 a). Además, en la Fig. 1.13 b, se muestran los resultados para los niveles de TBARS en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteínas). El valor promedio para los machos fue de 0.7 ± 0.1 ($n=5$); para las hembras 1.0 ± 0.1 ($n=7$) y para los pichones de 1.4 ± 0.2 ($n=13$). En ambos casos, se observaron niveles significativamente mayores en los pichones.

Se evaluaron los tioles en plasma (mM), (Fig.1.13 c) y en glóbulos rojos (Fig. 1.13 d). Los valores promedio para los primeros fue de 41.7 ± 5.7 ($n=9$) para los machos, 34.0 ± 3.5 ($n=9$) para las hembras y 35.8 ± 3.9 ($n=10$) para los pichones. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales (Anova y post-test de Newman-Keuls). Sin embargo, en los glóbulos rojos, se encontraron diferencias significativas en los niveles de tioles ($\mu\text{moles/mg}$ de proteínas) que fueron para el grupo de los machos 3.7 ± 0.6 ($n=9$), para las hembras 5.7 ± 1.2 ($n=10$) y para los pichones 13.2 ± 2.8 ($n=10$).

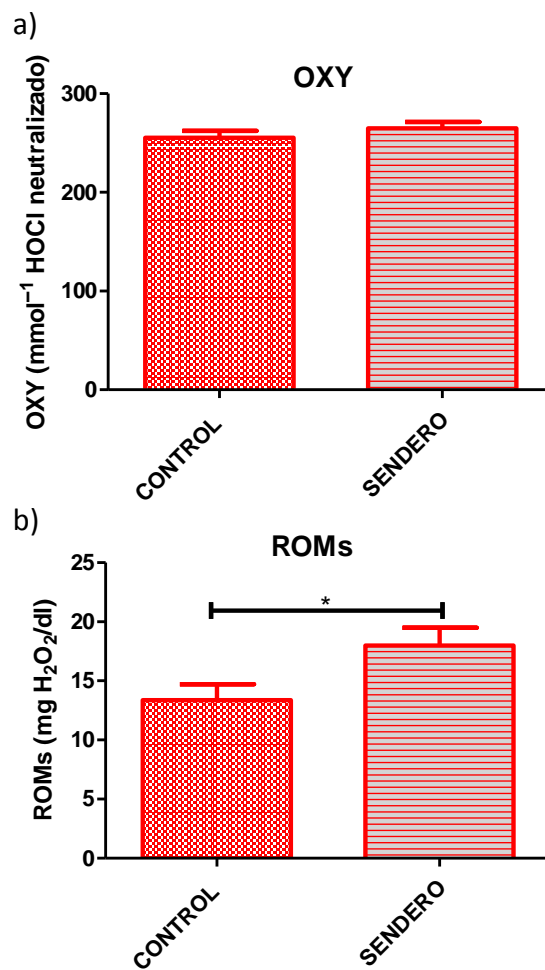


Fig. 1.12 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) OXY (mmol⁻¹HOCl n), b) ROMs (mg H₂O₂/dl). Anova y post-test de Newman-Keuls (*P<0.05, **P<0.01).

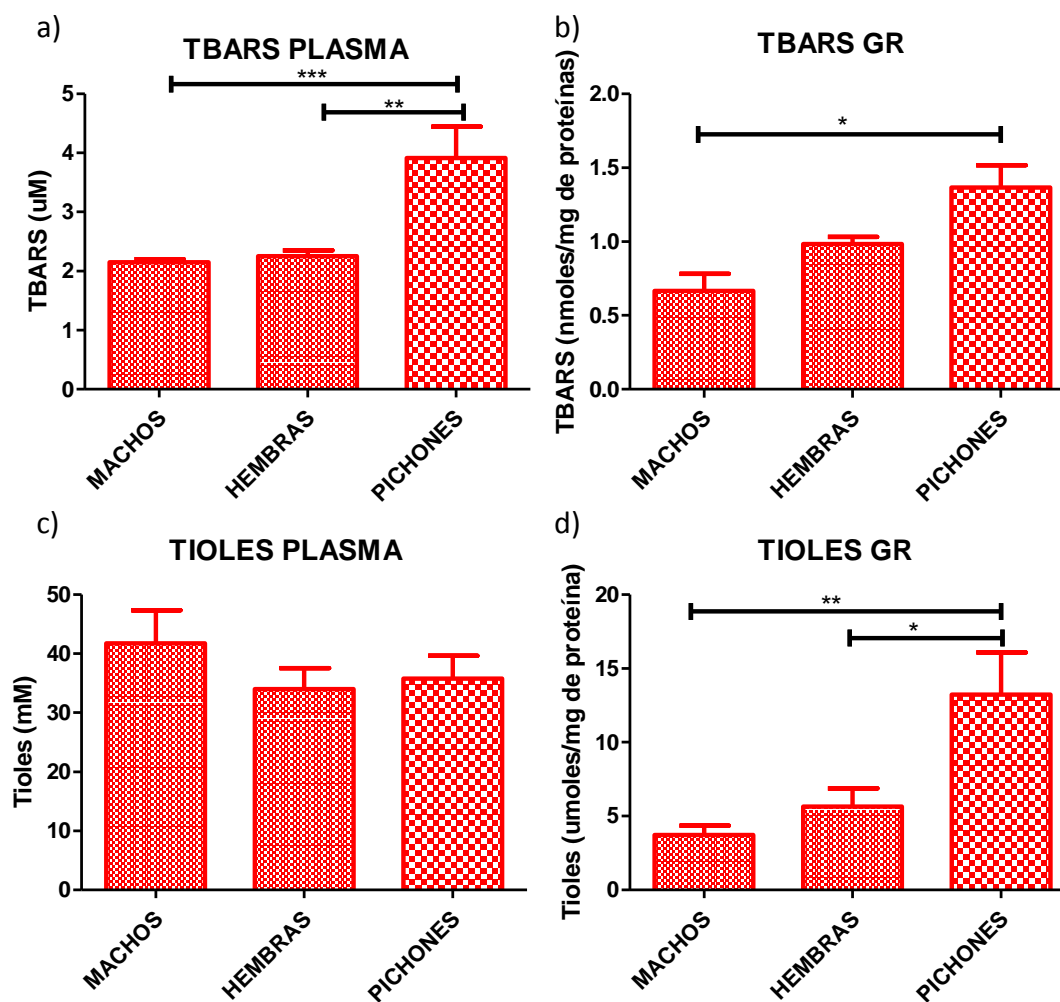


Fig. 1.13 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) TBARS (μM) en plasma, b) TBARS en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteínas), c) Tioles totales no proteicos en plasma (mM), d) Tioles totales no proteicos en glóbulos rojos ($\mu\text{moles/mg}$ de proteínas). Anova y post-test de Newman-Keuls ($P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).*

Al estudiar las enzimas antioxidantes, se observó que el valor promedio para la glutatión S-transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$) en plasma (Fig.1.14 a), fue de 0.014 ± 0.003 ($n=7$) para los machos; 0.024 ± 0.009 ($n=6$) para las hembras y 0.016 ± 0.005 , ($n=9$) para los pichones. También se evaluó la glutatión reductasa en glóbulos rojos ($\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína), (Fig. 1.14 b). Los valores promedio fueron de 0.019 ± 0.006 ($n=9$) para los machos, 0.002 ± 0.001 ($n=3$) para las hembras y 0.07 ± 0.04 ($n=6$) para los pichones. En ninguno de los dos casos se observaron diferencias significativas.

Al analizar la actividad de la catalasa en glóbulos rojos (U/mg de proteína), se observaron diferencias significativas en los 3 grupos, siendo la media 36.8 ± 1.2 ($n=15$) para los machos, 27.9 ± 3.8 ($n=9$) para las hembras y 10.6 ± 1.1 ($n=13$) para pichones, (Fig. 1.14 c).

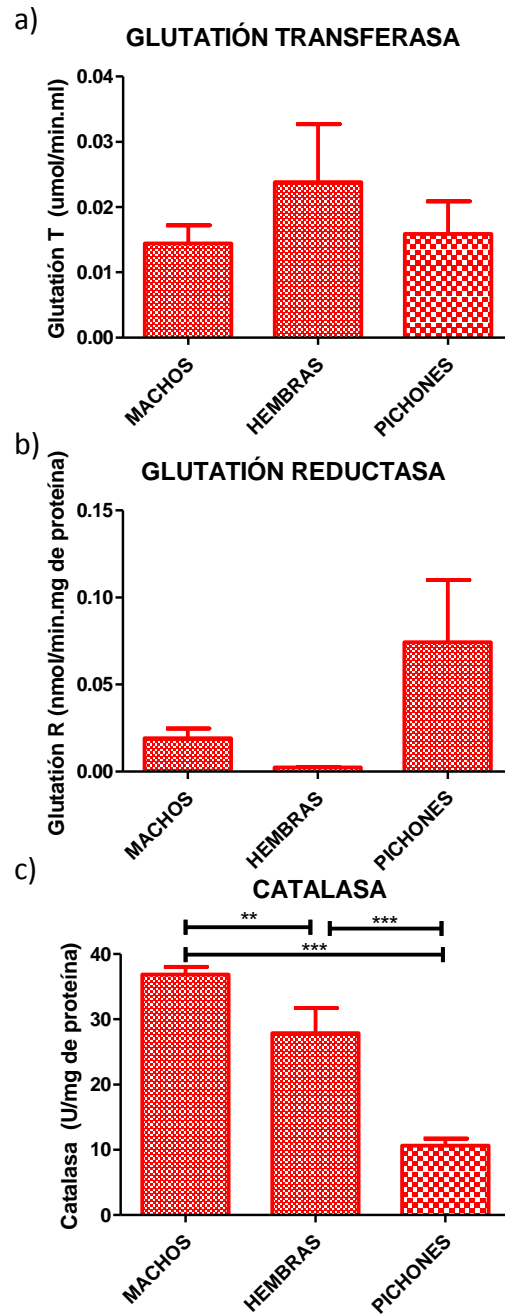


Fig. 1.74 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) Glutación transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{ml}$), b) Glutación reductasa ($\text{nmol}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína), c) Actividad de la catalasa (U/mg de proteína). Anova y post-test de Newman-Keuls (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

DISCUSIÓN 1

Es de amplio conocimiento que uno de los obstáculos que presenta el análisis de parámetros hematológicos y de estrés es la variabilidad interespecífica, incluso para el mismo proceso bioquímico. Debido a ello, es esencial el conocimiento de los niveles basales de la actividad de determinadas enzimas o procesos metabólicos. La edad, el sexo y el estado reproductivo como también, las perturbaciones ambientales incluido los impactos humanos, pueden influir en los resultados estos parámetros (Fossi 1994).

Los pingüinos son considerados centinelas del ambiente marino, ya que pueden revelar la tasa y la naturaleza de los cambios que ocurren en los océanos meridionales (Boersma 2008). Debido a la dependencia y especificidad que los pingüinos tienen con los recursos que ellos utilizan, son buenos indicadores biológicos que pueden mediante su monitoreo, identificar cambios en el ambiente (González 2000).

El turismo es una de las actividades humanas que puede generar un impacto desfavorable en la supervivencia o en el éxito reproductivo de las aves (Nisbet 2000). En particular, las ciudades de la costa Patagónica concentran gran parte de los servicios que constituyen la oferta turística de la región. Varias colonias de aves y mamíferos marinos son visitadas anualmente por una gran cantidad de turistas nacionales y extranjeros. Es importante resaltar, que la cantidad de visitantes ha aumentado constantemente en los últimos años (Honey 2008). El ecoturismo en Patagonia es compatible con la presencia y reproducción de muchas especies, cuya sensibilidad difiere frente al comportamiento inadecuado de visitantes. La presencia humana puede, en ciertas ocasiones, producir la interrupción de la reproducción, la mortalidad de crías, la pérdida de huevos o pichones, entre otros efectos negativos sobre las colonias de aves marinas (Yorio y Col. 1996, Martínez Rivarola y Col. 1996, Bertellotti 2013).

Una de las colonias más importante de pingüinos de Magallanes en la costa Patagónica se localiza en la Estancia San Lorenzo (SL). La actividad turística se inició en el año 2000 y desde entonces, el número de visitas se fue incrementando a lo largo de los años.

Actualmente recibe aproximadamente 10000 turistas al año (M. Machinea, comunicación personal 2012).

Esta colonia es ideal para evaluar el impacto del turismo sobre estos animales silvestre ya que es un área natural protegida, declarada patrimonio de la humanidad por la UNESCO. Las visitas sólo se realizan en un área específica bien definida de la colonia, delimitada por un sendero, donde los turistas sólo pueden transitar caminando dentro de sus límites (la llamamos zona sendero).

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto ambiental, sobre diferentes parámetros hematológicos y de estrés oxidativo, que permitan alertar sobre posibles cambios fisiológicos en la población de animales y de esta manera contribuir a pautas de manejo responsable. En esta primera sección de resultados nos propusimos determinar si el turismo podría producir impactos sobre estos individuos, comparando pingüinos que anidan en zonas que reciben turismo (sendero) y zonas no disturbadas (control). Para ello, en primer lugar, realizamos la comparación de diferentes parámetros hematológicos (glucemia, proteínas totales, hematocrito, colesterol, enzimas hepáticas, recuento de leucocitos) ampliamente utilizados para la evaluación del impacto ambiental sobre la salud del animal o de las poblaciones (Fudge 2000; Sergent y Col. 2004; Muller 2005).

Los resultados demostraron que no se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre la población de animales de la zona control respecto de la zona sendero. Incluso, no se encontró diferencia en la relación H/L, un parámetro indicador de estrés fisiológico en aves (Davis y Col. 2008).

Estos resultados son coincidentes con estudios previos que demostraron que no se encontraron diferencias en el éxito reproductivo (cantidad de huevos puestos, de pichones nacidos, de pichones sobrevivientes hasta las 5 semanas de vida), en la hormona del estrés (corticosterona), en la frecuencia cardíaca, en el crecimiento de pichones ni en las respuestas comportamentales entre los pingüinos de Magallanes que se encontraban en los senderos turísticos comparados con los de la zona control de la Estancia SL (Villanueva y Col. 2007, 2010).

Otros estudios sobre los efectos del turismo en otras especies de pingüinos arrojaron diferentes resultados, dependiendo de la especie y de la colonia estudiada. Se observaron efectos negativos del turismo en pingüinos de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) en Chile, donde los pingüinos tuvieron un éxito reproductivo menor y frecuencias cardíacas mayores en sitios expuestos al turismo (Ellenberg y Col. 2006). Walker y Col. 2006, encontraron que los niveles basales de corticosterona eran similares entre la población expuesta y no expuesta a la presión turística. Por su parte, los pichones de pingüinos de Adelia (*Pygoscelis adeliae*) presentaron éxitos de eclosión mayores y menor supervivencia en colonias visitadas por el turismo y con monitoreos científicos (Giese 1996).

A pesar de la gran utilidad del estudio del estrés oxidativo en la investigación bioquímica y médica, el número de reportes que demuestren su relevancia en estudios del efecto antropogénico sobre los animales silvestres son escasos (Constantini 2008; Beaulieu y Constantini 2014). Hasta el momento no hay estudios que demuestren la utilidad de parámetros de estrés oxidativo como “indicadores” de estrés en aves marinas.

A diferencia de los parámetros hematológico descritos anteriormente, los análisis de estrés oxidativo demostraron que animales expuestos al turismo (zona sendero) presentaron mayores niveles del biomarcador de daño oxidativo ROMs. Asimismo, observamos una reducción en los niveles de tioletos, un reconocido antioxidante, conjuntamente con un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes glutatión transferasa y catalasa, probablemente para compensar el aumento del estrés oxidativo. Por otra parte, no se encontraron diferencias en otras determinaciones como TBARS, glutatión reductasa o niveles de OXY.

El aumento de glutatión transferasa se ha asociado a alteraciones metabólicas, cardíacas, diabetes, hipertensión, desórdenes hepato-biliares y daño hepático. En otras especies marinas, como el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*), se ha reportado un aumento de la actividad de esta enzima durante el periodo de ayuno de las crías destetadas, el cual se ha sugerido junto con otros factores, como un mecanismo preventivo de daño oxidativo (Vázquez-Medina y Col. 2011).

Es importante resaltar que a pesar de no haber encontrado diferencias significativas en parámetros de estrés fisiológicos como la relación H/L, se mostró un significativo aumento de ROMs en la población expuesta al turismo y algunas variaciones de los niveles de antioxidantes, lo que podría sugerir que la evaluación de parámetros de estrés oxidativo como ROMs y OXY podrían ser bioindicadores de estrés más sensibles que los parámetros hematológicos habitualmente evaluados. Hasta donde sabemos, este sería el primer estudio que permite evaluar la influencia del turismo sobre parámetros de estrés oxidativo en aves marinas.

Los parámetros clínicos hematológicos y bioquímicos de las especies, pueden ser usados como indicadores del buen estado de salud del animal (Sergent y Col. 2004; Flammer 2004). Sin embargo, pocos son los trabajos que reportan los rangos hematológicos de referencia de especies aviares marinas locales que permitan ser utilizados como herramienta para el seguimiento y monitoreo de poblaciones. En pingüinos de Magallanes particularmente, existen aún menos reportes. Por otra parte, considerando la influencia de factores como el sexo, la edad y la zona de anidación de una misma especie, es vital determinar el perfil de estos parámetros teniendo en cuenta los mismos para poder utilizar estos valores hematológicos de manera correcta.

En el presente trabajo de tesis, se estudiaron diferentes parámetros hematológicos y bioquímicos, teniendo en cuenta el sexo y la edad, con el fin de establecer bases de datos de referencia que permitan, mediante su monitoreo, detectar cambios en el ambiente con potencial impacto en los individuos.

Los adultos y pichones mostraron las mayores diferencias en distintos parámetros analizados. Los pichones mostraron valores significativamente mayores de glucemia y colesterol, mientras que exhibieron menores valores de proteínas totales y de hematocrito que los adultos. Por el contrario, en el pingüino de Adelia (*Pygoscelis adeliae*) y Papúa (*Pygoscelis papúa*), se encontraron menores niveles de glucosa en sangre de pichones, respecto de adultos (D'Amico y Col. 2014).

El mayor nivel de colesterol en pichones respecto de adultos podría estar asociado a la dieta. Estudios previos sugieren que los adultos maximizan la calidad del alimento para alimentar a sus pichones, eligiendo aquellos con mayor contenido energético y calidad proteica (Forero y Col. 2002). Asimismo, D'Amico y Col. 2014 observaron que pichones de pingüinos Adélie de la Antártida, presentaban menor concentración de colesterol que los adultos. Contrariamente con lo que sucede con los pingüinos de Papúa, también de la Antártida, lo que podría estar relacionado con procesos anabólicos (Alonso-Álvarez y Col. 2002).

Al igual que en el trabajo de Meyer y Harvey (2000), encontramos menores niveles de hematocrito en pichones respecto de adultos. Estos autores describen algunos de los factores que participan en el desarrollo de la anemia neonatal los que incluyen, menor producción de glóbulos rojos durante el periodo neonatal temprano, rápido crecimiento con hemodilución resultante de la expansión del volumen plasmático total con mayor rapidez que la masa eritrocitaria total. Incluso, en algunas especies, la producción de glóbulos rojos esta reducida debido a las bajas concentraciones de la eritropoyetina al nacimiento (Meyer y Harvey 2000).

Las proteínas totales se utilizan comúnmente como indicadores de estado de salud y también están relacionados con el sistema inmune, especialmente asociadas a la producción de anticuerpos (Bouda y Col. 2004). Asimismo, cambios en las concentraciones totales de proteínas pueden observarse con la edad (Hochleithner 1994). Un estudio en diferentes aves a los 30 y 90 días de vida demostró menores niveles de hematocrito y de proteínas totales en todos los casos a los 30 días (Ritchie y Col. 1994). En otras especies de pingüinos como los Adélie y Papúa muestreados en las Islas Shetland del Sur, también se demostraron menores niveles de proteínas totales en los pichones comparados con los adultos (D'Amico y Col. 2014).

Respecto de las enzimas hepáticas estudiadas, encontramos que los pichones presentan menores niveles de aspartato aminotransferasa, mientras que muestran mayores actividades de fosfatasa alcalina y de pseudocolinesterasa, sin observar diferencias

significativas en la alanina transaminasa y la lactato deshidrogenasa, comparado con los adultos.

La fosfatasa alcalina, es una enzima ampliamente distribuida en el organismo que hidroliza los monoésteres del ácido ortofosfórico en medio alcalino. La actividad sérica de la enzima se incrementa cuando existe daño tisular en alguno de los tejidos de origen (Meyer y Harvey, 2000). Los valores de fosfatasa alcalina en pichones también superaron los valores encontrados por Ghebremisk y Col. 1989; Wallace y Col. 1995; Moreno-Salas y Col. 2014; en diferentes especies de pingüinos adultos.

La pseudocolinesterasa, se encuentra en plasma, hígado, músculo liso y adipocitos y constituye un índice de función hepática ya que, la disminución de la concentración sanguínea es indicadora de daño celular en este órgano. Como demostramos en este trabajo, se describió previamente que los niveles de enzima aspartato aminotransferasa se relacionan en forma inversa con los de pseudocolinesterasa (Bergmeyer y Horder 1980).

Por otro lado, no se observaron diferencias en la relación H/L, pero sí en el recuento de leucocitos totales, encontrándose menores valores en los pichones respecto a los adultos. El trabajo de D'Amico y Col. 2014 muestra que los pichones de los pingüinos Papúa también presentan niveles menores de leucocitos totales comparado con los animales adultos. Resultados opuestos se observaron en el caso de los pingüinos Adelia (D'Amico y Col. 2014).

Hasta el momento son pocos los estudios que evalúan la posible influencia de la edad y el sexo sobre el sistema antioxidante en aves silvestres (Koivula y Eeva 2010). De esta manera, consideramos de gran importancia este trabajo, dado que se reportan por primera vez los valores de una variedad de parámetros de estrés oxidativo, medidos en sangre.

El estudio de OXY demostró menor capacidad antioxidante en pichones comparado con adultos y no se ha apreciado diferencia significativa en los niveles de ROMs. La evaluación de la peroxidación lipídica, se utiliza ampliamente como un indicador estrés oxidativo, ya que la mayoría de las ERO reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados presentes en la

membrana celular, lo que lleva al daño estructural de la célula, fallo metabólico y muerte celular. Por lo tanto, la evaluación del nivel de TBARS es útil en la investigación de la peroxidación de lípidos (Lima y Abdalla 2001, Kohen y Nyska 2002). Observamos mayores niveles de TBARS y también de tioles en pichones, este último tal vez como una estrategia para contrarrestar el daño.

Dentro de los componentes enzimáticos antioxidantes, evaluamos la actividad de la catalasa, la glutatión reductasa y transferasa. Los pichones presentaron menor actividad de la enzima catalasa respecto de los adultos, lo que puede asociarse a la menor capacidad antioxidante y al aumento de los niveles de TBARS observados.

En contraposición con nuestros resultados obtenidos en pingüinos de la colonia de SL, otros autores sugieren que el daño oxidativo aumenta con la edad, provocado por un aumento en la producción de ERO y/o a una mayor susceptibilidad a las ERO en aves adultas (Martin y Grotewiel 2006; Halliwell y Gutteridge 2007).

Las hembras presentaron mayores niveles de proteínas totales, de aspartato y alanina aminotransferasas, además de un aumento en el número de leucocitos totales respecto de los machos. Al igual que en el trabajo de Sergent y Col. (2004), las hembras de pingüinos azules o pequeños (*Eudyptula minor*) exhibieron mayores niveles de proteínas totales comparados con los machos, lo que se asoció a la producción de huevos (Sergent y Col. 2004). Castillo Torres (2015), también observó mayores niveles de proteínas totales en hembras, al comparar ambos sexos, aunque estudió otra especie de ave. Se encontraron similitudes en la media de proteínas totales reportada en el trabajo de Ghebremeskel y Col. (1989) en pingüinos de Magallanes.

Respecto a las enzimas hepáticas, la aspartato aminotransferasa es un sensible indicador de lesión hepática, pero es muy poco específica ya que también se encuentra en altas concentraciones en otros tejidos como el músculo esquelético y cardiaco, riñón, o cerebro. Por su parte, el valor diagnóstico de la alanina aminotransferasa en aves es limitado, ya que está presente en muchos tejidos y su actividad es muy baja (Garcia 2016).

Nuestros resultados coinciden con el rango de valores publicados en otras especies de pingüinos como los de la Isla de Galápagos (*Spheniscus mendiculus*) (Travis y Col. 2006). También, los valores de las medias para alanina aminotransferasa, hematocrito y proteínas totales, están dentro del rango que publica Canepuccia y Col. (2000), cuando describe los valores para los pingüinos de Magallanes considerados sanos. Asimismo, los niveles de las aminotransferasas, están dentro del rango publicado por Wallace y Col. (1995) que estudian pingüinos de Humboldt (*Spheniscus humboldti*). En cuanto al resto de los parámetros evaluados, no difieren entre machos y hembras.

Algunos trabajos de aves proponen que las hembras tienen una mayor capacidad antioxidante que los machos (Halliwell y Gutteridge 2007). En este trabajo de tesis, sólo observamos diferencias en los niveles de catalasa que fueron menores en las hembras comparadas con los machos.

Por su parte, los niveles de TBARS en plasma en la colonia SL fueron menores que los determinados en pingüinos de Magallanes analizados en el trabajo de Romero y Col. 2015. Esto puede deberse a que aquellos animales se encontraban empetroados, en recuperación o en refugios.

Otros autores estudiaron los niveles de tioles totales en otras especies de aves marinas como petreles (*Pachyptila desolata*) y priones (*Halobaena caerulea*) (Costantini y Bonadonna 2009), los niveles de glutatión transferasa en golondrina (Raja-aho y Col. 2012), la actividad de la enzima catalasa en gorriones (*Passer domesticus*) (Herrera-Dueñas y Col. 2013), la actividad de la glutatión reductasa en cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*) (Oropesa y Col. 2013) y los niveles de OXY en gaviotas (García-Tarrasón y Col. 2014). Los resultados mostrados son diferentes a los que registramos en este trabajo. No es posible realizar una comparación debido a que en estos trabajos se estudian otras especies de aves que se encuentran en condiciones totalmente diferentes. Newman (1997), muestra que para un mismo parámetro hematológico, el resultado difiere notoriamente, según la especie de ave.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de parámetros de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes que contempla edad, sexo y además la influencia del turismo.

Si bien los análisis hematológicos han demostrado ser útiles para detectar cambios ambientales en algunas especies de aves (Haratym-Maj 2002), en el presente trabajo no se encontraron cambios en ninguno de los parámetros estudiados cuando comparamos individuos que anidan en zona control respecto de aquellos expuestos al turismo. Sin embargo, se observaron niveles significativamente mayores de ROMs, indicador de daño oxidativo, en individuos sometidos a presión turística. Esto sugiere que la evaluación de parámetros de estrés oxidativo en animales silvestres, podría representar una herramienta más sensible para detectar cambios ambientales y poder de esta manera, evaluar el estado de salud de los pingüinos de Magallanes. Asimismo, los resultados de este estudio describen las características hematológicas y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes que anidan en la colonia SL teniendo en cuenta la edad y el sexo, información que no se había reportado al momento. Estos hallazgos podrán ser utilizados como línea de referencia para trabajos posteriores, pudiendo ser utilizados por investigadores para evaluar la salud de las poblaciones, comparar con otras especies de otros lugares y extrapolar las técnicas a otras especies.

Resultados 2

Parámetros hematológicos y de
estrés oxidativo en pingüinos de
Magallanes de la colonia Isla
Quiroga, Santa Cruz

RESULTADOS 2

2.1 PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y HEMATOLÓGICOS EN PINGÜINOS DE MAGALLANES QUE ANIDAN EN LA ISLA QUIROGA

La contaminación costera, las actividades pesqueras, la quema de combustibles, el vertido o derrame de residuos sólidos y líquidos, el cambio climático, son algunos de los factores antropogénicos que pueden afectar negativamente la supervivencia y el éxito de alimentación y reproducción de varias especies silvestres, entre ellas las aves (Fundación Patagonia Natural 1999). Los efectos de la contaminación, la degradación ambiental, los cambios en la disponibilidad de las especies presa, el cambio climático, pueden evidenciarse a través de la observación o monitoreo de algunas poblaciones de aves marinas (Piatt y Sydeman 2007). Por lo tanto, las aves marinas se las han considerado como bioindicadores ambientales (Green y Figuerola 2003; Nam y Lee 2006; Pan y Col. 2008; Naccari y Col. 2009; Herrera-Dueñas y Col. 2013).

Varios estudios han resaltado la importancia del estrés oxidativo en el campo de la ecotoxicología, por su relación con el impacto que generan los contaminantes. La susceptibilidad al estrés oxidativo es útil para el monitoreo de los impactos ambientales, ya que se puede utilizar para describir respuestas celulares a los contaminantes y otras fuentes de estrés en organismos. Uno de los mecanismos a los que se atribuye la toxicidad a los metales pesados, plaguicidas organoclorados e hidrocarburos, es su capacidad de inducir estrés oxidativo, ya sea de forma directa generando ERO, o de forma indirecta inhibiendo el sistema antioxidante celular (Ercal y Col. 2001; Abdollahi y Col. 2004). Un aumento en la formación de ERO puede resultar en estrés oxidativo. Colombini y Col. (2008), reportaron que, de todas las provincias, Santa Cruz presentaba mayores niveles de hidrocarburos. Diversos estudios experimentales han mostrado la capacidad de los metales pesados e hidrocarburos de inducir estrés oxidativo en diferentes seres vivos (Sandhir y Gill 1995; Simon-Giavarotti y Col. 2002; Toplan y Col. 2003), incluidas las aves (Mateo y Col. 2003; Hoffman y Col. 2005). Por lo tanto, la evaluación de los niveles de

moléculas antioxidantes, de las actividades de determinadas enzimas antioxidantes, y también la determinación de los productos del daño oxidativo pueden ser útiles indicadores de exposición a estos contaminantes (Gil y Pla 2001).

El objetivo de esta segunda sección fue evaluar, en pingüinos de Magallanes que se reproducen en una colonia expuesta a hidrocarburos por su cercanía a un puerto (Puerto Deseado, Isla Quiroga), el efecto ambiental analizando algunos parámetros de estrés oxidativo y hematológicos. Al igual que en la primera sección, se estudiaron estos parámetros en sangre de los animales, teniendo en cuenta el sexo y edad para establecer bases de datos de referencia, para posteriores trabajos comparativos.

2.2 Parámetros hematológicos de pingüinos de Magallanes que anidan en la colonia Isla Quiroga en función del sexo y la edad

En la Fig. 2.1 a, se muestran los niveles de glucosa (mg/dl) en sangre entera. Los valores promedio fueron para los machos 133.2 ± 3.9 (n=21); para las hembras 125.1 ± 3.8 (n=10) y para los pichones 159.4 ± 6.7 (n=17), encontrándose valores significativamente mayores en los pichones.

En la Fig. 2.1 b, se observan los niveles de proteínas totales (g/dl), siendo las medias para los machos 6.7 ± 0.2 (n=21), para las hembras 6.7 ± 0.2 (n=11) y para los pichones 5.7 ± 0.1 (n=17).

Además, se analizó el hematocrito (%) (Fig. 2.1 c). Los valores promedio fueron para los machos 40.9 ± 1.4 (n=21), para las hembras 42.2 ± 1.8 (n=10) y para los pichones 29.5 ± 1.9 (n=17).

Tanto para las proteínas totales como para el hematocrito se observó significativamente menores valores en los pichones.

Se evaluó la concentración de colesterol (mg/dl), las medias fueron para los machos 210.1 ± 15.9 (n=13); para las hembras 195.3 ± 9.8 (n=7) y para los pichones 353.7 ± 30.5 (n=9) (Fig. 2.2 a). Se observaron niveles significativamente mayores en los pichones respecto de los adultos.

En la Fig. 2.2 b se muestran los resultados para la enzima alanina aminotransferasa (UI/L). Los valores promedio fueron para machos 57.4 ± 9.2 (n=11); para hembras 79.8 ± 25.6 (n=5) y para pichones 37.0 ± 7.2 (n=7). En la Fig. 2.2 c se muestran las medias para la enzima aspartato aminotransferasa (UI/L), que en machos fue 184.7 ± 17.0 (n= 12); en hembras 197.0 ± 33.8 , (n=7) y en pichones 126.7 ± 12.3 , (n=9). Para estas enzimas, no se observaron diferencias significativas entre adultos y pichones.

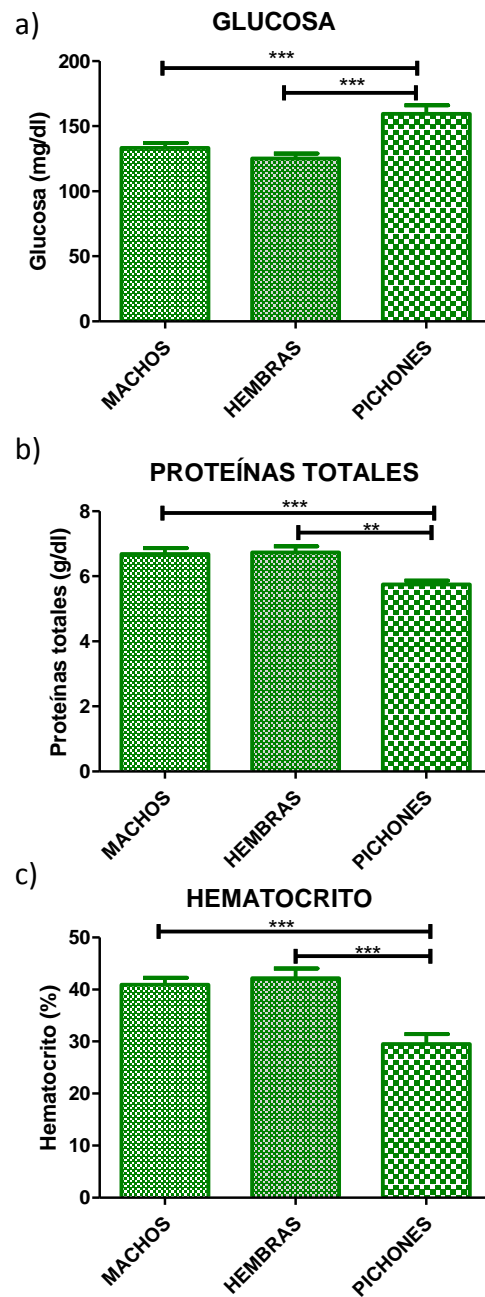


Fig. 2.1 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Glucosa (mg/dl), b) Proteínas totales (g/dl), c) Hematocrito (%). Anova y post-test de Newman-Keuls (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

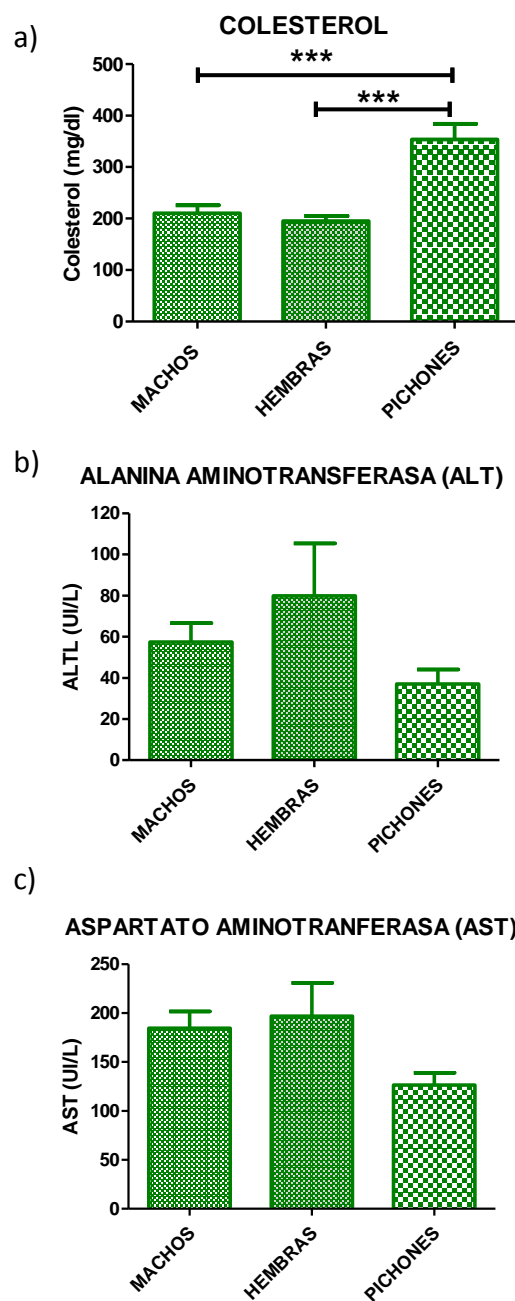


Fig. 2.2 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Colesterol (mg/dl), b) Alanina aminotransferasa (UI/L), c) Aspartato aminotransferasa (UI/L). Anova y post-test de Newman-Keuls (*) $P < 0.001$.**

También, se evaluó la enzima fosfatasa alcalina (UI/L), siendo los valores promedio 79.2 ± 11.3 (n=13), 56.5 ± 6.0 (n=4) y 457.3 ± 49.4 (n=9), para machos, hembras y pichones, respectivamente (Fig. 2.3 a), observándose en los pichones mayores niveles comparado con los adultos.

Las medias de la enzima lactato deshidrogenasa (UI/L) correspondieron a 589.1 ± 40.6 (n=11) para los machos; 671.7 ± 138.0 (n=3) para las hembras y 709.9 ± 49.9 (n=9) para los pichones (Fig. 2.3 b). No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Por último, se evaluó a la enzima pseudocolinesterasa (UI/L). Las medias fueron para los machos 3662 ± 212 (n=13); para las hembras 3009 ± 571 (n=3) y para los pichones 6243 ± 758 (n=8) (Fig. 2.3 c), observándose en los pichones mayores niveles comparado con los adultos.

La relación H/L mostró valores similares para adultos (machos: 1.3 ± 0.1 , n=22; hembras: 1.1 ± 0.1 , n=10) y para los pichones (1.2 ± 0.1 , n=17) (Fig. 2.4 a). Los valores de leucocitos totales fueron 58.6 ± 3.9 (n=22), 69.2 ± 6.3 (n=10) y 60.1 ± 3.7 (n=17) para machos, hembras y pichones, respectivamente (Fig. 2.4 b). No se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros ni en el porcentaje de los diferentes leucocitos (Tabla 2.1).

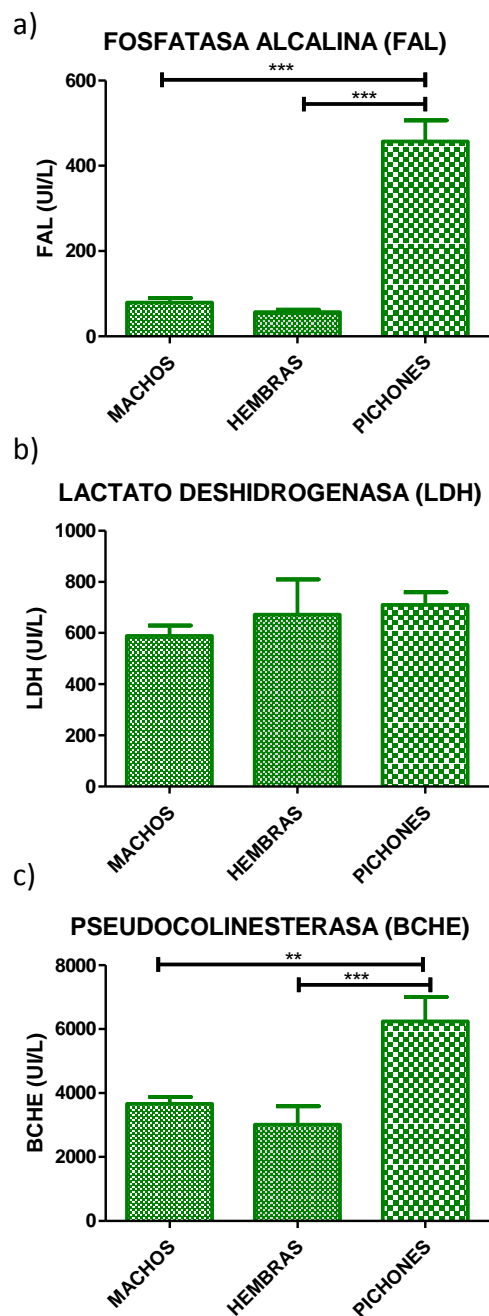


Fig. 2.3 Resultados de los parámetros hematológicos: a) Fosfatasa alcalina (UI/L), b) Lactato deshidrogenasa (UI/L), c) Pseudocolinesterasa (UI/L). Anova y post-test de Newman-Keuls (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

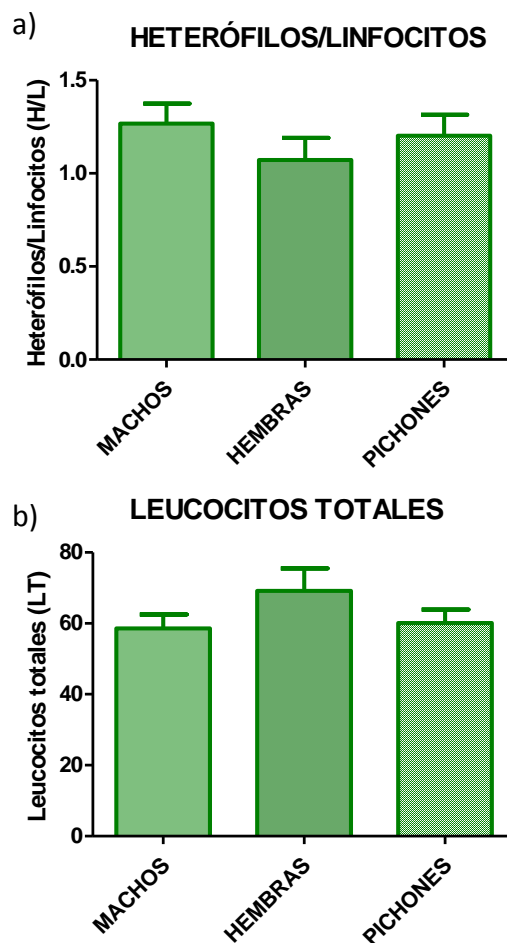


Fig. 2.4 Resultados de los parámetros hematológicos: a) H/L, b) Leucocitos totales. Anova y post-test de Newman-Keuls. ($P > 0.05$).

Tabla 2.2: Fórmula leucocitaria en pingüinos de Magallanes adultos y pichones.

Individuo	Colonia	Basófilos (%)	Eosinófilos (%)	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)
Machos (n=22)	IQ	0.4±0.1	11.7±0.9	44.9±1.2	38.4±1.7	4.8±0.4
Hembras (n=10)	IQ	0.3±0.1	14.1±1.2	40.2±2.1	39.8±2.4	5.9±0.8
Pichones (n=27)	IQ	0.3±0.1	11.6±0.9	43.8±2.0	39.8±2.2	4.9±0.4

Los resultados informan la media±ESM del porcentaje de los diferentes leucocitos. (n= número de muestra).

2.3 Parámetros de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes que anidan en la colonia de Isla Quiroga en función del sexo y la edad

La capacidad antioxidante total del plasma se midió mediante la determinación colorimétrica OXY-Adsorbent ($\text{mmol}^{-1}\text{HOCl}$ neutralizado), en el plasma de los animales. Las medias fueron para los machos 243.8 ± 9.8 ($n=21$); para las hembras 237.3 ± 16.9 ($n=10$) y para pichones 279.6 ± 10.1 ($n=17$), (Fig. 2.5 a).

Además, se determinaron los niveles de ROMs ($\text{mgH}_2\text{O}_2/\text{dl}$) (Fig. 2.5 b), siendo los valores promedio 14.9 ± 2.4 ($n=22$); 18.7 ± 2.6 ($n=10$) y 16.6 ± 2.0 ($n=17$), para machos, hembras y pichones, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos casos.

Se determinaron los niveles de TBARS en plasma (μM) (Fig. 2.6 a). Los valores promedios fueron para los machos 4.8 ± 0.8 ($n=19$); para las hembras 4.2 ± 0.8 ($n=9$) y para los pichones 4.6 ± 0.8 ($n=14$). También se midieron los TBARS en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteínas), siendo las medias para los machos 0.6 ± 0.1 ($n=12$); para las hembras 0.5 ± 0.1 ($n=9$) y para los pichones 0.6 ± 0.1 ($n=9$), (Fig. 2.6 b).

En la Fig. 2.6 c se muestran los niveles tioles totales no proteicos en plasma (mM), siendo los valores promedio para los machos 44.7 ± 4.4 ($n=7$); para las hembras 55.4 ± 11.4 ($n=9$) y para los pichones 84.9 ± 14.8 ($n=10$). Además, se determinaron los niveles tioles totales no proteicos en glóbulos rojos ($\mu\text{moles}/\text{mg}$ de proteína), que fueron para los machos 2.9 ± 0.3 ($n=9$); para las hembras 4.5 ± 0.7 ($n=9$) y para los pichones 4.6 ± 0.6 ($n=10$), (Fig. 2.6 d).

En ninguno de estos análisis se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales.

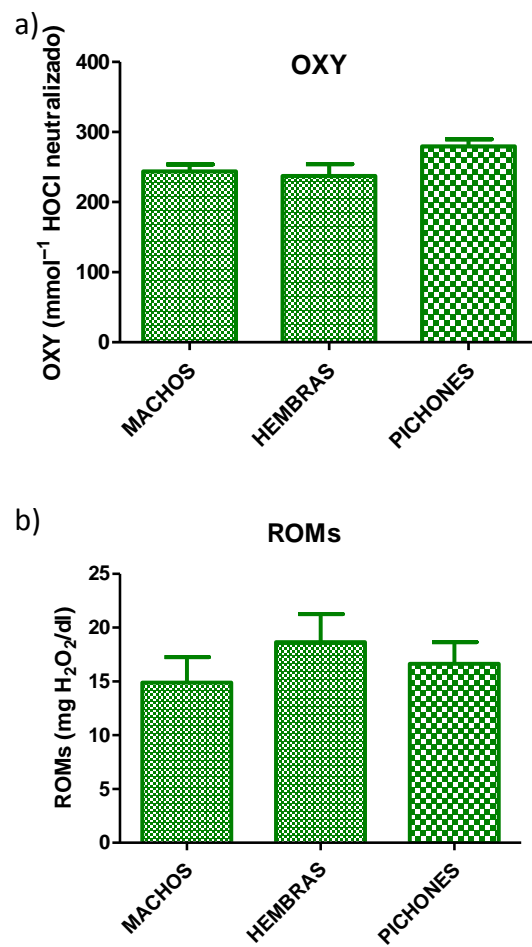


Fig. 2.5 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) OXY (mmol⁻¹HOCl n), b) ROMs (mgH₂O₂/dl). Anova y post-test de Newman-Keuls (P>0.05).

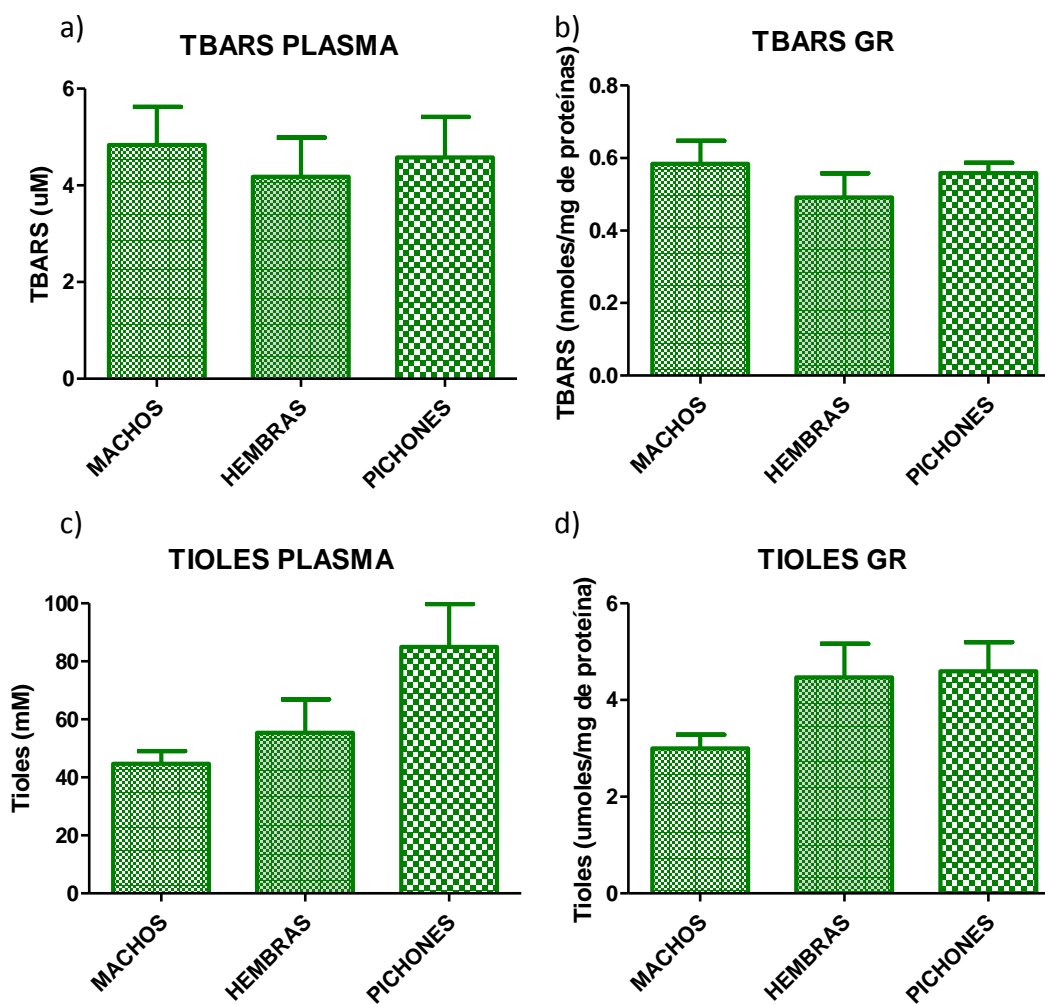


Fig.2.6 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) TBARS en plasma (μM), b) TBARS en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteínas), c) Tioles totales no proteicos en plasma (mM), d) Tioles totales no proteicos en glóbulos rojos ($\mu\text{moles/mg de proteína}$). Anova y post-test de Newman-Keuls ($P > 0.05$).

Se determinó la glutatión S-transferasa en plasma ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{ml}$) (Fig. 2.7 a), las medias fueron para el grupo de los machos 0.033 ± 0.008 ($n=6$); para las hembras 0.016 ± 0.004 ($n=9$) y para pichones 0.004 ± 0.007 ($n=9$). Además en la Fig. 2.7 b, se muestran las medias de glutatión reductasa en glóbulos rojos ($\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína), para los machos 0.03 ± 0.01 ($n=9$), para las hembras 0.04 ± 0.001 ($n=3$) y para los pichones 0.05 ± 0.01 , ($n=10$). No se detectaron diferencias significativas entre los grupos para ambas enzimas antioxidantes.

También se determinó la actividad de la catalasa en glóbulos rojos (U/mg de proteína) (Fig. 2.7 c), los valores promedios fueron para los machos 30.7 ± 2.2 , ($n=13$); para las hembras 37.5 ± 4.7 , ($n=9$) y para los pichones se observaron valores significativamente menores (16.3 ± 1.6 , $n=14$).

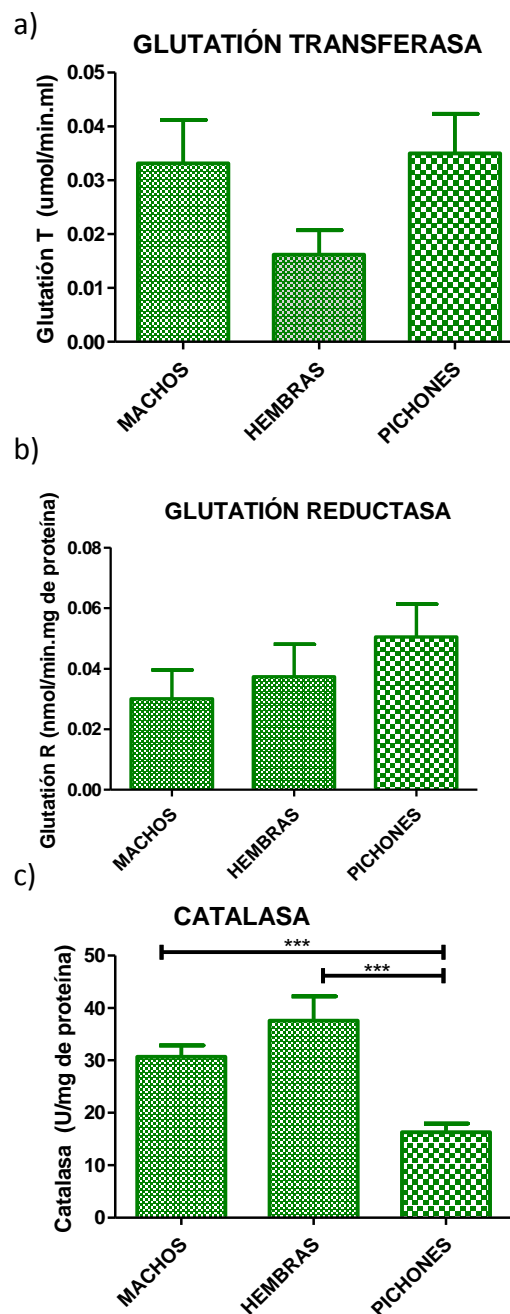


Fig. 2.7 Resultados de los parámetros de estrés oxidativo: a) Glutathión transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{ml}$), b) Glutathión reductasa ($\text{nmol}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína), c) Actividad de la catalasa (U/mg de proteína). Anova y post-test de Newman-Keuls ($***P<0.001$).

DISCUSIÓN 2

En esta segunda sección de resultados, se reportan los valores de los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de los pingüinos de Magallanes que anidan en la Isla Quiroga (IQ), con el fin de establecer rangos fisiológicos de referencia para los individuos de esta colonia. Como se mencionó en la discusión de la sección 1, estos resultados serán una herramienta indispensable como línea de base, para poder realizar una correcta evaluación de los posibles impactos ambientales sobre la especie. Se observaron diferencias en los parámetros hematológicos entre adultos y pichones. Los pichones mostraron valores significativamente mayores de glucemia y colesterol, mientras que exhibieron menores valores de proteínas totales y de hematocrito, del mismo modo sucedió en la colonia de SL. Al igual que describimos en la discusión de los resultados de la sección 1, estos hallazgos están en línea otros trabajos realizado en pichones de pingüinos de Magallanes, los cuales demuestran mayores niveles de colesterol respecto de adultos (Forero y Col. 2002). Los niveles de glucosa sanguínea reflejan las condiciones nutricionales, emocionales y endocrinas del sujeto. Aumenta después de la comida (hiperglucemia alimentaria), también durante la excitación probablemente como efecto de la liberación de norepinefrina. Por su parte, los valores de proteínas totales son coincidentes con los publicados por Canepuccia y Col. (2000) y Villouta y Col. (2007), en pingüinos de Humboldt (*Spheniscus humboldti*). En otras especies de pingüinos, también se demostraron menores niveles de proteínas totales en los pichones comparados con los adultos (D'Amico y Col. 2014) y se encontraron menores niveles de hematocrito en pichones (Meyer y Harvey 2000). Estos últimos niveles de hematocrito fueron menores a los obtenidos en pingüinos de Magallanes después de la rehabilitación por contaminación con petróleo (Caraiola 2012).

Los pichones mostraron niveles mayores de fosfatasa alcalina y pseudocolinesterasa que los adultos, coincidentemente con lo observado en la colonia SL, como se describió en la

sección de resultados 1. Algunos autores sugieren que las enzimas hepáticas están aumentadas en pichones de avestruces y a partir del año de edad empiezan a disminuir paulatinamente (Olrog 1997; Palomeque 1997). El trabajo de Ghebremisk y Col. (1989), en pingüinos de Magallanes antes de mudar, demuestra valores de alanina aminotransferasa similares a los pichones de este trabajo. Los niveles para la enzima aspartato aminotransferasa, fueron mayores a los obtenidos en esta tesis. Por su parte, los niveles de fosfatasa alcalina reportados estaban dentro del rango de los machos y hembras analizados en esta tesis (Ghebremisk y Col. 1989).

Con respecto a los parámetros de estrés oxidativo, en esta colonia de pingüinos de Magallanes, no observamos diferencias significativas entre pichones y adultos en ninguno de los parámetros estudiados excepto por una menor actividad de la enzima catalasa en pichones. Halliwell y Gutteridge (2007), reportaron en aves que las hembras presentan mayor capacidad antioxidante, mientras que en nuestro trabajo sólo se observó una actividad significativamente mayor en la actividad de la catalasa. Además, estos autores propusieron que el daño oxidativo aumentaba con la edad. Sin embargo, en pingüinos de la colonia IQ, no se apreció esta tendencia. Los niveles de glutatión transferasa y reductasa de los individuos que anidan en IQ fueron más bajos si los comparamos con las cigüeñas blancas (*Ciconiaciconia*), estudiadas en el trabajo de Oropesa y Col. (2013). En este trabajo, no se observaron diferencias en los niveles de OXY y ROMs entre pingüinos machos y hembras. Sin embargo, los valores obtenidos en esta tesis resultan mayores a los publicados previamente por Beaulieu y Col. 2010 en (*Pygoscelis adeliae*), lo que podría deberse a que los pingüinos son de otra especie y además podrían influir otros factores como la alimentación, zona geográfica, etc.

Los niveles de TBARS no mostraron diferencias cuando comparamos sexo y edad de los pingüinos de la colonia IQ, a diferencia de lo observado en la colonia de SL, donde se observaron diferencias significativas en parámetros de estrés (OXY, TBARS en plasma y glóbulos rojos y tioles en glóbulos rojos) entre pichones y adultos. Esta similitud entre adultos y pichones podría ser resultado de una igual exposición de ambas categorías de edad a contaminantes a través de la dieta.

Los cambios en los parámetros sanguíneos pueden ser útiles como marcadores bioquímicos de la toxicidad o contaminación ambiental de ciertos productos químicos (Haratym-Maj 2002). Los ecologistas han mostrado recientemente un gran interés en el uso de los indicadores fisiológicos de la salud de las poblaciones animales considerándolo una herramienta valiosa (Beaultel y Col. 2013). Como se nombró en la sección 1 estos resultados podrán ser utilizados como línea de referencia para trabajos posteriores.

Resultados 3

Comparación de los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes que anidan en las colonias de San Lorenzo y de Isla Quiroga

Resultados 3

3.1 Comparación de los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes que anidan en las colonias de San Lorenzo y de Isla Quiroga

La Isla Quiroga (IQ) se encuentra a sólo 2300 metros en línea recta de la ciudad de Puerto Deseado y a 1500 metros del puerto aproximadamente (Bogetti 2009). No hay trabajos actuales que traten sobre la contaminación en la Ría. Sin embargo, en campañas realizadas en el año 1994 y 1995 se encontraron valores positivos de hidrocarburos aromáticos en agua y sedimentos (Esteves y Col. 1997). La ciudad de Puerto Deseado ha sufrido un importante aumento poblacional en los últimos quince años, mostrando un crecimiento de la actividad industrial y portuaria que ha provocado un incremento notable en las presiones sobre el medio ambiente. Estas actividades humanas, pueden afectar directa o indirectamente las especies de aves que nidifican o utilizan la Ría como área de alimentación o paso. Las mayores amenazas son la contaminación derivada de la actividad portuaria y las industrias pesqueras (Gandini y Frere 1996). El pingüino de Magallanes es una de las especies más afectadas por la contaminación con hidrocarburos en la costa Patagónica conjuntamente con otras, como el pingüino penacho amarillo (*Eudyptes chrysocome*) y algunas especies de gaviotas (Gandini y Col. 1994). Sin embargo, los estudios que evalúen parámetros hematológicos o indicadores de estrés en las poblaciones bajo algún tipo de contaminación, son escasos en aves e inexistentes para el caso del pingüino de Magallanes. En esta sección de resultados, nos propusimos comparar los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo obtenidos para los pingüinos de la colonia IQ teniendo en cuenta el sexo y la edad, con aquellos obtenidos para la colonia San Lorenzo (SL) fuera del área de impacto turístico, que consideramos sanos.

Las siguientes tablas (3.1, 3.2 y 3.3) muestran la comparación de los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes que anidan en las colonias de SL e IQ.

Tabla 3.1 Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos macho.

	MACHOS SL	MACHOS IQ	P
Glucosa (mg/dl)	145.4±3.1 (n= 21)	133.2±3.9 (n=21)	* 0.0188
Proteínas totales (g/dl)	6.6±0.1 (n=21)	6.7±0.2 (n=21)	
Hematocrito (%)	38.8±1.9 (n=21)	40.9±1.4 (n=21)	
Colesterol (mg/dl)	252.9±14.4 (n=10)	210.1±15.9 (n=13)	
Alanina aminotransferasa (UI/L)	26.8±4.5 (n=8)	57.4±9.2 (n=11)	*0.0166
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	201.0±19.8 (n=8)	184.7±17.0 (n= 12)	
Fosfatasa alcalina (UI/L)	38.5±3.5 (n=8)	79.2±11.3 (n=13)	*0.0127
Lactato deshidrogenasa (UI/L)	529.0±73.4 (n=7)	589.1±40.6 (n=11)	
Pseudocolinesterasa (UI/L)	3381±328 (n=7)	3662±212 (n=13)	
Heterofilos/linfocitos (H/L)	1.1±0.2 (n=13)	1.3±0.1 (n=22)	
Leucocitos totales	59.5±3.1 (n=13)	58.6±3.9 (n=22)	
OXY (mmol⁻¹HOCL neutralizado)	265.9±6.3 (n=21)	243.8±9.8 (n=21)	
ROMs (mgH₂O₂/dl)	16.0±1.3 n=21	14.9±2.4 (n=22)	
TBARS plasma (µm)	2.2±0.1 (n=17)	4.8±0.8 (n=19)	*0.0044
TBARS GR (nmoles/mg de prot)	0.7±0.1 (n=5)	0.6±0.1 (n=12)	
Tioles plasma (mM)	41.7±5.7 (n=9)	44.7±4.4 (n=7)	
Tioles GR (µmoles/mg de prot)	3.7±0.6 (n=9)	2.9±0.3 (n=9)	
Glutación T plasma (µmol/min.ml)	0.014±0.003 (n=7)	0.033±0.008 (n=6)	*0.0155
Glutación R GR (nmol/min.mg prot)	0.019±0.006 (n=9)	0.030±0.009 (n=9)	
Catalasa (U/mg prot)	36.8±1.2 (n=15)	30.7±2.2 (n=13)	*0.0180

Se muestra el promedio ± el desvío estándar y el tamaño muestral (n) para pingüinos de Magallanes. GR= glóbulos rojos; prot=proteínas; R= reductasa; T= transferasa; SL= San Lorenzo; IQ= Isla Quiroga. Se realizó el estudio estadístico T-Test. Solo se informan los P de aquellos parámetros que presentan diferencia significativa.

Los resultados indican que los pingüinos machos de la colonia IQ presentan menores niveles de glucemia mientras que presentan mayores niveles de alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina y TBARS en plasma (Tabla 3.1). Además, exhiben mayor actividad de glutación transferasa y menor actividad de catalasa (Tabla 3.1).

Por su parte, en hembras también se observa una menor glucemia, mayores niveles de TBARS y menor capacidad antioxidante total en plasma de pingüinos IQ respecto de SL (Tabla 3.2).

En los pichones de IQ se observaron niveles significativamente mayores de proteínas totales, hematocrito, capacidad antioxidante total (total), tioles en plasma y catalasa. Además, menores valores de glucemia y tioles totales en glóbulos rojos se apreciaron en pichones de la colonia IQ en comparación con aquellos de la colonia SL (Tabla 3.3).

Tabla 3.2 Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos hembra.

	HEMBRAS SL	HEMBRAS IQ	P
Glucosa (mg/dl)	140.4±3.7 (n=11)	125.1±3.8 (n=10)	**0.0096
Proteínas totales (g/dl)	7.2±0.2 (n=11)	6.7±0.2 (n=11)	
Hematocrito (%)	44.2±1.8 (n=11)	42.2±1.8 (n=10)	
Colesterol (mg/dl)	211.0±4.6 (n=3)	195.3±9.8 (n=7)	
Alanina aminotransferasa (UI/L)	48.0±5.0 (n=2)	79.8±25.6 (n=5)	
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	314.5±81.5 (n=2)	197.0±33.8 (n=7)	
Fosfatasa alcalina (UI/L)	34.0±6.0 (n=2)	56.5±6.0 (n=4)	
Lactato deshidrogenasa (UI/L)	525.0±133.0 (n=2)	671.7±138.0 (n=3)	
Pseudocolinesterasa (UI/L)	2153±303 (n=2)	3009±571 (n=3)	
Heterofilos/linfocitos (H/L)	1.1±0.1 (n=14)	1.1±0.1 (n=10)	
Leucocitos totales	73.4±5.7 (n=14)	69.2±6.3 (n=10)	
OXY (mmol ⁻¹ HOCL neutralizado)	281.8±9.9 (n=11)	237.3±16.9 (n=10)	*0.0314
ROMs (mgH ₂ O ₂ /dl)	14.4±1.7 (n=11)	18.7±2.6 (n=10)	
TBARS plasma (µm)	2.3±0.1 (n=8)	4.2±0.8 (n=9)	*0.00425
TBARS GR (nmoles/mg de prot)	1.0±0.1 (n=7)	0.5±0.1 (n=9)	*0.0026
Tioles plasma (mM)	34.0±3.5 (n=9)	55.4±11.4 (n=9)	
Tioles GR (µmoles/mg de prot)	5.7±1.2 (n=10)	4.5±0.7 (n=9)	
Glutación T plasma (µmol/min.ml)	0.024±0.009 (n=6)	0.016±0.004 (n=9)	
Glutación R GR (nmol/min.mg prot)	0.002±0.001 (n=3)	0.04±0.01 (n=9)	
Catalasa (U/mg prot)	27.9±3.8 (n=9)	37.5±4.7 (n=9)	

Se muestra el promedio ± el desvío estándar y el tamaño muestral (n) para pingüinos de Magallanes. GR= glóbulos rojos; prot=proteínas; R= reductasa; T= transferasa; SL= San Lorenzo; IQ= Isla Quiroga. Se realizó el estudio estadístico T-Test. Solo se informan los P de aquellos parámetros que presentan diferencia significativa.

Tabla 3.3 Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos pichones.

	PICHONES SL	PICHONES IQ	P
Glucosa (mg/dl)	179.5±3.9 (n=22)	159.4±6.7 (n=17)	**0.0096
Proteínas totales (g/dl)	5.2±0.1 (n=22)	5.7±0.1 (n=17)	**0.0013
Hematocrito (%)	21.6±1.9 (n=22)	29.5±1.9 (n=17)	**0.0064
Colesterol (mg/dl)	343.8±35.2 (n=6)	353.7±30.5 (n=9)	
Alanina aminotransferasa (UI/L)	32.3±6.5 (n=6)	37.0±7.2 (n=7)	
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	136.5±6.9 (n=6)	126.7±12.3 (n=9)	
Fosfatasa alcalina (UI/L)	607.8±54.2 (n=6)	457.3±49.4 (n=9)	
Lactato deshidrogenasa (UI/L)	683.8±77.7 (n=6)	709.9±49.9 (n=9)	
Pseudocolinesterasa (UI/L)	7856±313 (n=5)	6243±758 (n=8)	
Heterofilos/linfocitos (H/L)	1.3±0.1 (n=55)	1.2±0.1 (n=17)	
Leucocitos totales	47.9±2.2 (n=56)	60.1±3.7 (n=17)	
OXY (mmol ⁻¹ HOCL neutralizado)	242.4±7.6 (n=19)	279.6±10.1 (n=17)	**0.0053
ROMs (mgH ₂ O ₂ /dl)	16.7±2.3 (n=11)	16.6±2.0 (n=17)	
TBARS plasma (µm)	3.9±0.5 (n=11)	4.6±0.8 (n=14)	
TBARS GR (nmoles/mg de prot)	1.4±0.2 (n=13)	0.6±0.1 (n=9)	**0.0053
Tioles plasma (mM)	35.8±3.9 (n=10)	84.9±14.8 (n=10)	**0.0049
Tioles GR (µmoles/mg de prot)	13.2±2.8 (n=10)	4.6±0.6 (n=10)	**0.0076
Glutación T plasma (µmol/min.ml)	0.016±0.005 (n=9)	0.004±0.007 (n=9)	
Glutación R GR (nmol/min.mg prot)	0.07±0.04 (n=6)	0.05±0.01 (n=10)	
Catalasa (U/mg prot)	10.6±1.1 (n=13)	16.3±1.6 (n=14)	**0.0078

Se muestra el promedio \pm el desvío estándar y el tamaño muestral (n) para pingüinos de Magallanes. GR= glóbulos rojos; prot=proteínas; R= reductasa; T= transferasa; SL= San Lorenzo; IQ= Isla Quiroga. Se realizó el estudio estadístico T-Test. Solo se informan los P de aquellos parámetros que presentan diferencia significativa.

DISCUSIÓN 3

Las mediciones y exámenes del laboratorio anormales se definen clínicamente como aquellos valores que no encuadran dentro de los límites del rango de referencia, lo que podría ser indicativo de una enfermedad o disfunción fisiológica. Los valores hematológicos de los animales sanos pueden variar según las características individuales y el entorno de una población. Por lo tanto, los intervalos de referencia en hematología varían de acuerdo con la edad y el sexo, entre otros factores. En la actualidad, los valores hematológicos son una herramienta valiosa en el monitoreo ambiental, ya que a través del diagnóstico de los individuos de una población, permiten la toma de decisiones para el manejo de un ambiente determinado. Para contribuir al estudio del efecto potencial de contaminantes, en este trabajo de tesis se describen rangos de referencia específico para la especie, edad, sexo y localidad geográfica.

La glucemia fue significativamente mayor en machos, hembras y pichones de San Lorenzo (SL) que en las mismas categorías de Isla Quiroga (IQ). Este parámetro podría estar indicando una mejor capacidad de alimentación en los pingüinos de SL respecto de los de la IQ. La colonia de SL se encuentra frente al golfo San Matías, una de las principales áreas de alimentación de pingüinos. Esta cercanía a las áreas de alimentación, podría reducir los tiempos de forrajeo e incluso aumentar la frecuencia de alimentación, con su consecuente impacto en la glucemia.

Por su parte, las enzimas plasmáticas alanina aminotransferasa y la fosfatasa alcalina tuvieron valores mayores en los pingüinos de la IQ, aunque sólo significativamente para machos. Estos valores podrían indicar algún tipo de daño hepático o renal, posiblemente por exposición a contaminantes orgánicos (fuel oil, petróleo, aceites, etc.) que comúnmente aparecen en las zonas portuarias. Esteves y Col. (1997) encontraron valores positivos de hidrocarburos aromáticos en agua y sedimentos en campañas realizadas en el año 1994 y 1995 en cercanías a la colonia de IQ.

En individuos adultos de ambos sexos se observó un aumento de la peroxidación lipídica en plasma en animales de IQ. Por otro lado, los niveles de antioxidante de los adultos de IQ fueron menores que en SL, tanto en la prueba de OXY (aunque sólo fue significativo en hembras) como en los valores de la actividad de la catalasa (que sólo registró diferencia en machos).

Por otra parte, los pichones son los que presentan mayores diferencias en los parámetros evaluados entre los pingüinos de la colonia IQ y SL. Los pingüinos pichones de la colonia IQ presentaron menores niveles de TBARS y tioles en glóbulos rojos. Contrariamente se registraron mayores niveles de tioles en plasma, OXY, actividad de la catalasa, hematocrito y proteínas totales. Estos resultados sugieren que las diferencias de los factores ambientales, la zona geográfica, la alimentación, entre otros, podrían producir cambios en los parámetros analizados. Los mayores niveles de TBARS en los pichones de SL podría estar asociado a que los nidos están expuestos a mayores temperaturas, ya que esta colonia se encuentra cerca del límite norte de la distribución de la especie. Por su parte, los mayores niveles de antioxidantes en sangre de pichones de IQ pueden estar asociados a los menores niveles de TBARS observados. Esto podría deberse a una estrategia celular para compensar el daño oxidativo producido por la exposición crónica a contaminantes, metales pesados, y otros disruptores fisiológicos (Buettner 1993). Resulta necesario evaluar con mayor detenimiento las variables ambientales que afectan ambas poblaciones, incluyendo temperaturas, disponibilidad de presas y exposición real a contaminantes y otros estresores, para establecer una relación causa-efecto entre la contaminación ambiental y las variaciones en los parámetros estudiados.

Una de las formas de evaluar el impacto de la contaminación desde el punto de vista fisiológico en las poblaciones silvestres es mediante la utilización de marcadores hematológicos y de estrés oxidativo, los cuales nos pueden dar alertas tempranas de algún efecto en los organismos de una población. La utilización de estos marcadores en la naturaleza, puede ser una herramienta que complemente los estudios tradicionales que sólo miden la carga de algún contaminante en particular.

Resultados 4

Parámetros de estrés oxidativo y hematológicos en pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo

RESULTADOS 4

4.1 Parámetros de estrés oxidativo y hematológicos en pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo

La contaminación por hidrocarburos generalmente resulta del lavado de tanques petroleros o pequeños derrames accidentales en el mar. Las rutas migratorias de las aves marinas o los sitios de alimentación muchas veces coinciden con el tránsito de buques petroleros, haciéndolas vulnerables al petróleo (Bertellotti 2013). El aceite puede manchar el plumaje impidiendo la flotabilidad y el aislamiento, además puede ser ingerido cuando el animal intenta limpiarse las plumas, produciendo una irritación gastrointestinal e incluso hemorragias, dañando la función del hígado y los riñones (Wiese y Ryan 2003; Bertellotti 2013). Debido a esto, se producen modificaciones del sistema enzimático generando diferentes sustancias pro-oxidantes que pueden desencadenar estrés oxidativo (Costantini 2008).

Los pingüinos de Magallanes son entre las aves marinas de la Patagonia, la especie más afectada por la contaminación con petróleo.

El objetivo de esta última sección de resultados fue evaluar algunos parámetros hematológicos y de estrés oxidativo durante la rehabilitación de tres pingüinos empetrolados provenientes del Área Natural Protegida Punta Tombo, Chubut, Argentina.

Durante la primavera del 2013, tres pingüinos de Magallanes (Fig. 4.1) con signos de empetrolamiento leve y que arribaron en la colonia reproductiva de Punta Tombo (44° 04' S y 65° 11' O) (Fig. 4.2), fueron remitidos al centro de rehabilitación perteneciente a la Dirección de Fauna y Flora Silvestre de Chubut. Allí fueron alimentados, lavados y rehabilitados para su posterior liberación en el mismo sitio donde fueron encontrados. A cada pingüino se le tomaron tres muestras de sangre (entre 1.5 y 3 ml) de la vena metatarsial, durante su estadía en el centro de rehabilitación. La 1ra muestra fue tomada cuando las aves ingresaron al centro (pingüino empetrolado) el 26/09/2013; la 2da fue

obtenida una semana más tarde cuando comenzó el proceso de lavado el 04/10/2013 y la 3ra fue tomada el 18/10/2014, cuando el plumaje de cada uno ya estuvo completamente limpio para ser liberado (pingüino rehabilitado). A cada pingüino se le registró el peso a su entrada y a lo largo de la rehabilitación.



Fig. 4.1 Pingüinos de Magallanes con escasas manchas de petróleo.

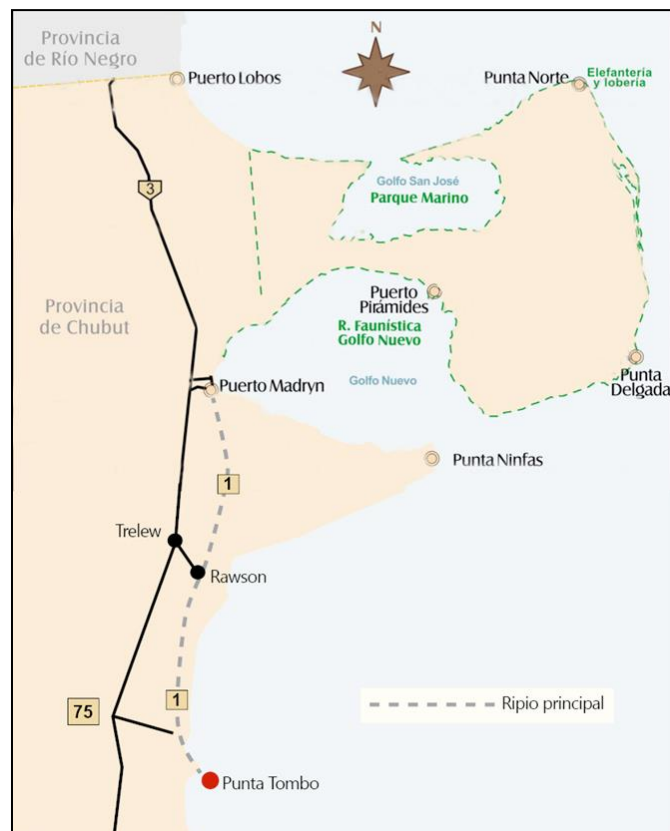


Fig. 4.2 Ubicación en el mapa de la colonia de pingüinos de Punta Tombo (punto rojo).

4.2 Parámetros hematológicos y morfométricos de pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo

El pingüino 1 fue un macho que ingresó con escasas manchas de petróleo y con sangre seca en sus plumas, pero no registró heridas. El análisis hematológico mostró que, entre la 1ra y 2da toma de muestras disminuyeron los leucocitos y luego aumentaron en la 3ra toma (Fig. 4.3 a). Mientras que la relación H/L y el hematocrito se mantuvieron constantes durante las tres tomas de sangre (Fig. 4.3 b y c). La glucosa disminuyó sus valores entre la 1ra y 2da toma, pero aumentaron sus valores en la 3ra (Fig. 4.3 d). Por el contrario, los niveles de proteínas totales aumentaron entre la 1ra y 2da toma de muestras y luego disminuyeron en la 3ra toma (Fig. 4.3 e). El peso del individuo fue aproximadamente constante desde su ingreso hasta la 3ra toma (Fig. 4.3 f).

El pingüino 2 fue una hembra que ingresó con escasas manchas de petróleo sin registrar heridas. Los leucocitos totales aumentaron desde la 1ra y hasta la 3ra toma de muestras (Fig. 4.3 a) en tanto que la relación H/L se mantuvo constante (Fig. 4.3 b). El hematocrito disminuyó considerablemente desde la 1ra hasta la 3ra toma de muestra (Fig. 4.3 c), mientras que la glucosa permaneció constante durante los tres muestreos (Fig. 4.3 d). Los valores de proteínas totales aumentaron desde la 1ra hasta la 3ra toma de muestra (Fig. 4.3 e). El peso aumentó entre la 1ra y 2da toma y luego se mantuvo constante (Fig. 4.3 f).

El tercer pingüino fue una hembra que presentó una importante mancha de petróleo en el cuello, sin registrar heridas. Los valores de leucocitos y de glucosa disminuyeron entre la 1ra y la 2da toma y luego aumentaron en la 3ra (Fig. 4.3 a y d), mientras que la razón H/L aumentó en la 3ra toma (Fig. 4.3 b). El hematocrito mostró valores similares en los tres muestreos (Fig. 4.3 c). Las proteínas totales mostraron un patrón inverso aumentaron en la 2da toma y luego disminuyeron su valor (Fig. 4.3 e). El peso aumentó entre la 1ra y 2da toma y luego se mantuvo constante hasta la 3ra (Fig. 4.3 f).

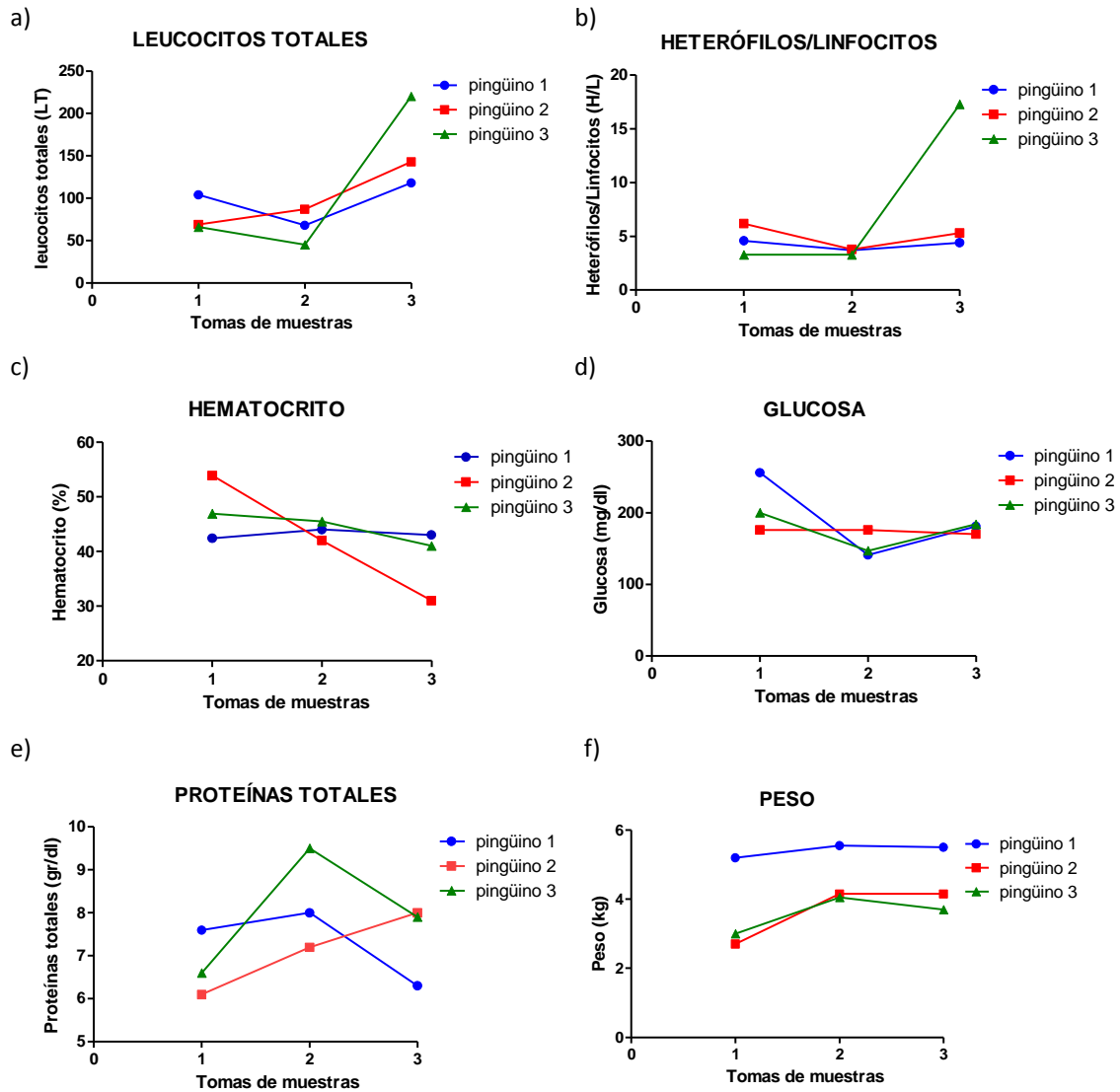


Fig. 4.3 Resultados de parámetros hematológicos y peso: a) Leucocitos totales, b) H/L, c) Hematocrito (%), d) Glucosa (mg/dl), e) Proteínas totales (g/dl), f) Peso (Kg).

3.3 Parámetros de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo

En el pingüino 1 cuando se evaluaron algunos parámetros de estrés oxidativo se observó un aumento de la actividad de la enzima catalasa (Fig. 4.4 a), de los niveles de tioles en plasma (Fig. 4.4 b) y en glóbulos rojos (Fig. 4.4 c) y de los niveles TBARS (Fig. 4.4 d) en la 2da toma respecto de la primera. Mientras que, en la 3ra toma la actividad de la enzima catalasa y los tioles en plasma mantuvieron sus niveles (Fig. 4.4 a y b). Los niveles de tioles en glóbulos rojos y los de TBARS disminuyeron en la 3ra toma (Fig. 4.4 c y d).

Observamos que el pingüino 2, tanto para la actividad de la enzima catalasa como para los niveles de tioles en plasma variaron muy poco a lo largo de los muestreos (Fig. 4.4 a y b). Los tioles en glóbulos rojos aumentaron considerablemente entre la 1ra y 2da toma, pero luego disminuyeron por debajo del valor inicial en el 3er muestreo (Fig. 4.4 c). Para TBARS por ser escasa la muestra, solo se registró el valor en la 3ra toma de muestra (Fig. 4.4 d).

Respecto al tercer pingüino, se observa que la actividad de la catalasa y los niveles de TBARS tienen valores similares en las tres tomas (Fig. 4.4 a y d). Mientras que, los tioles en plasma fueron similares entre la 1ra y 2da toma, pero en la 3ra aumentaron sus niveles considerablemente (Fig. 4.4 b). Los tioles en glóbulos rojos aumentaron sus niveles entre la 1ra y 2da toma y luego disminuyeron en la 3ra (Fig. 4.4 c).

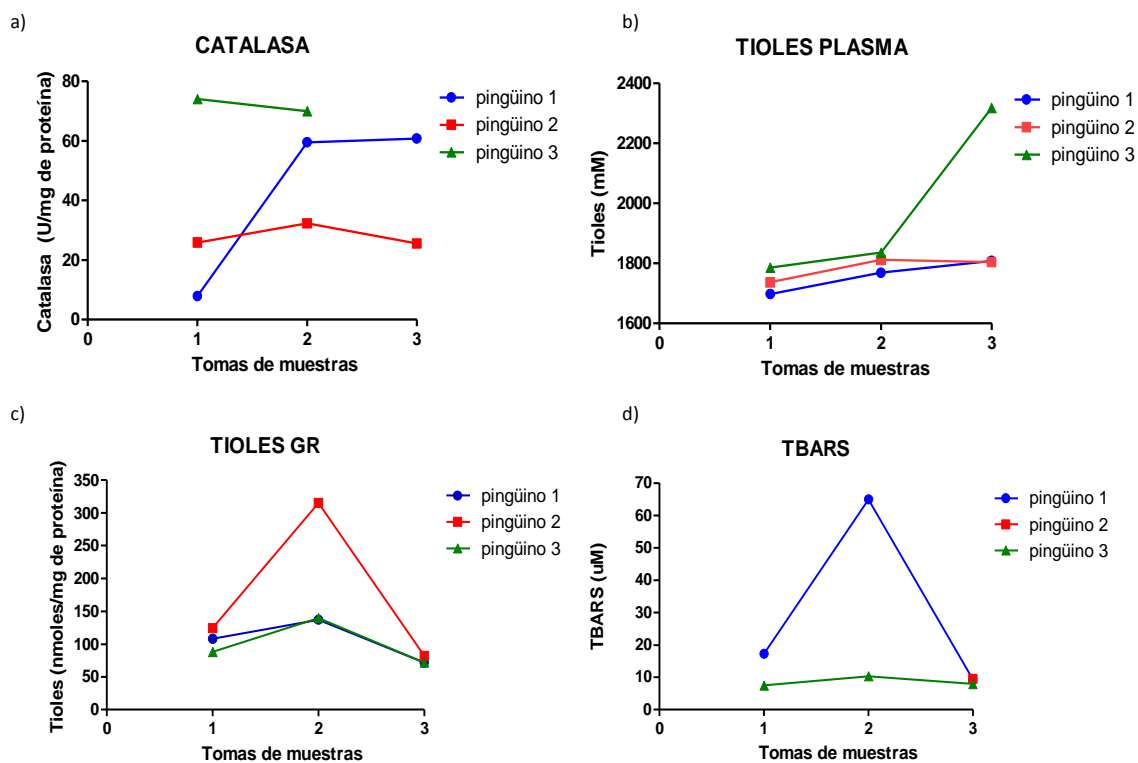


Fig. 4.4 Resultados de parámetros de estrés oxidativo: a) Actividad de la catalasa (U/mg de proteína), b) Tioles totales no proteicos en plasma (mM), c) Tioles totales no proteicos en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteína), d) TBARS en plasma (µM).

4.4 Comparación de parámetros hematológicos, morfométricos y de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo con pingüinos considerados sanos

Se compararon los parámetros hematológicos y morfométricos obtenidos para los pingüinos empetrolados (las 3 tomas de muestras) con los valores obtenidos en animales considerados sanos (adultos que anidan en zona control de la Estancia San Lorenzo) (Tabla 4.1).

Los resultados muestran que los pingüinos empetrolados (en las 3 tomas de muestra) presentan niveles significativamente mayores de leucocitos totales (Fig. 4.5 a) y mayor relación H/L comparados con los pingüinos sanos (Fig. 4.5 b). Además, presentan mayor glucemia (en la 1ra y 3er toma) (Fig. 4.5 d) y proteínas totales (2da y 3er toma) que los pingüinos considerados sanos (Fig. 4.5 e). No se encontraron diferencias significativas en el hematocrito (Fig. 4.5 c) o peso (Fig. 4.5 f) de los pingüinos empetrolados y aquellos considerados sanos.

De la misma manera, se compararon los parámetros de estrés oxidativo (Tabla 4.1).

Se observa en los pingüinos empetrolados niveles significativamente mayores de la actividad de la catalasa en la 2da toma de muestra (Fig. 4.6 a) y de tioles en plasma (en las 3 tomas de muestra) (Fig. 4.6 d). Por el contrario, en la 1ra, 2da y 3ra toma se registraron menores valores de tioles en glóbulos rojos (Fig. 4.6 c). Respecto a los niveles de TBARS en plasma se observa un aumento muy significativo en los pingüinos empetrolados (en las 3 tomas de muestra), respecto de los pingüinos considerados sanos (Fig. 4.6 b).

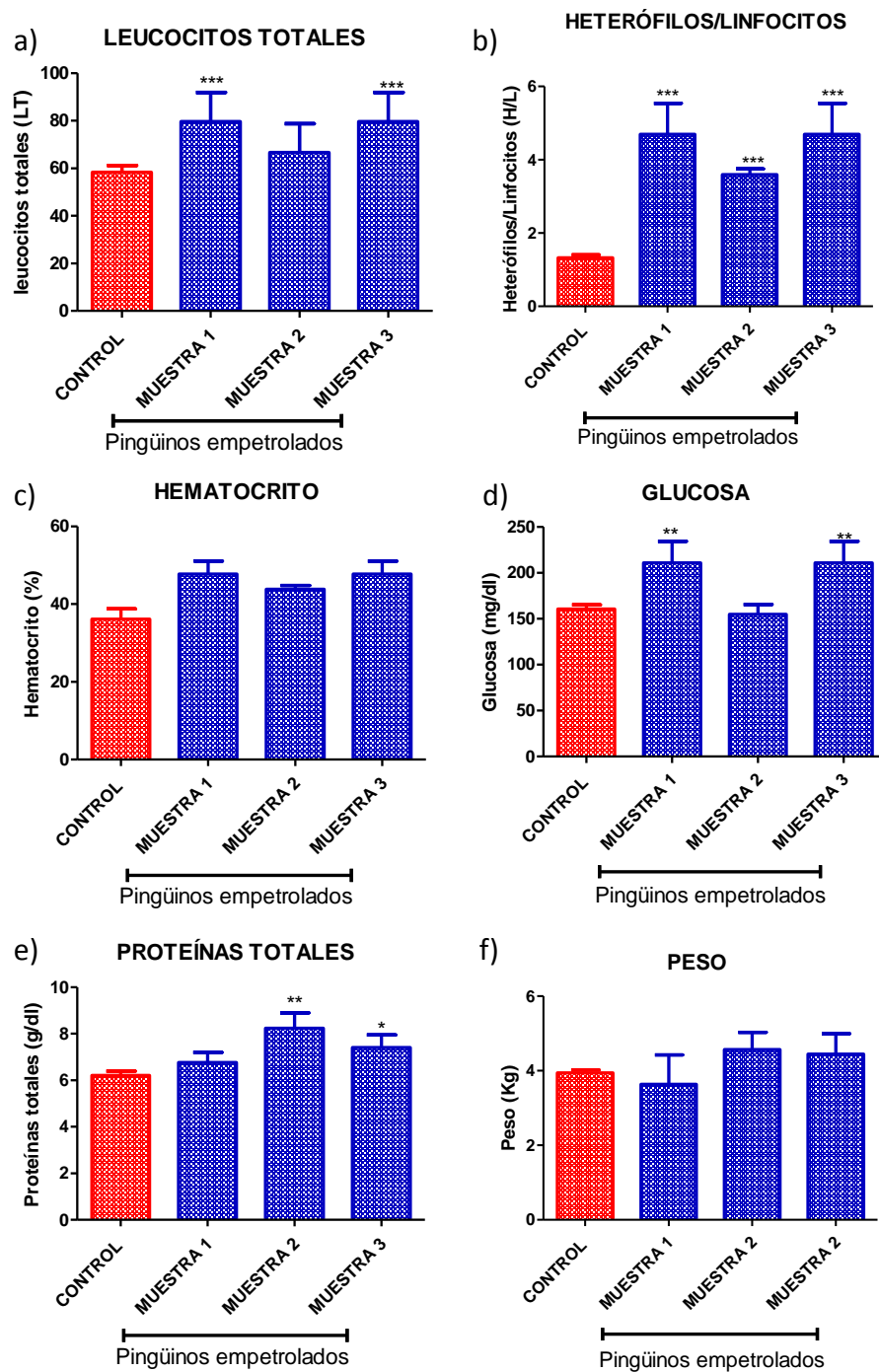


Fig. 4.5 Comparación de parámetros hematológicos entre pingüinos considerados sanos y pingüinos empetrolados (1°, 2° y 3ª toma de muestra): a) Leucocitos totales, b) H/L, c) Hematocrito (%), d) Glucosa (mg/dl), e) Proteínas totales (g/dl), f) Peso (Kg). T-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

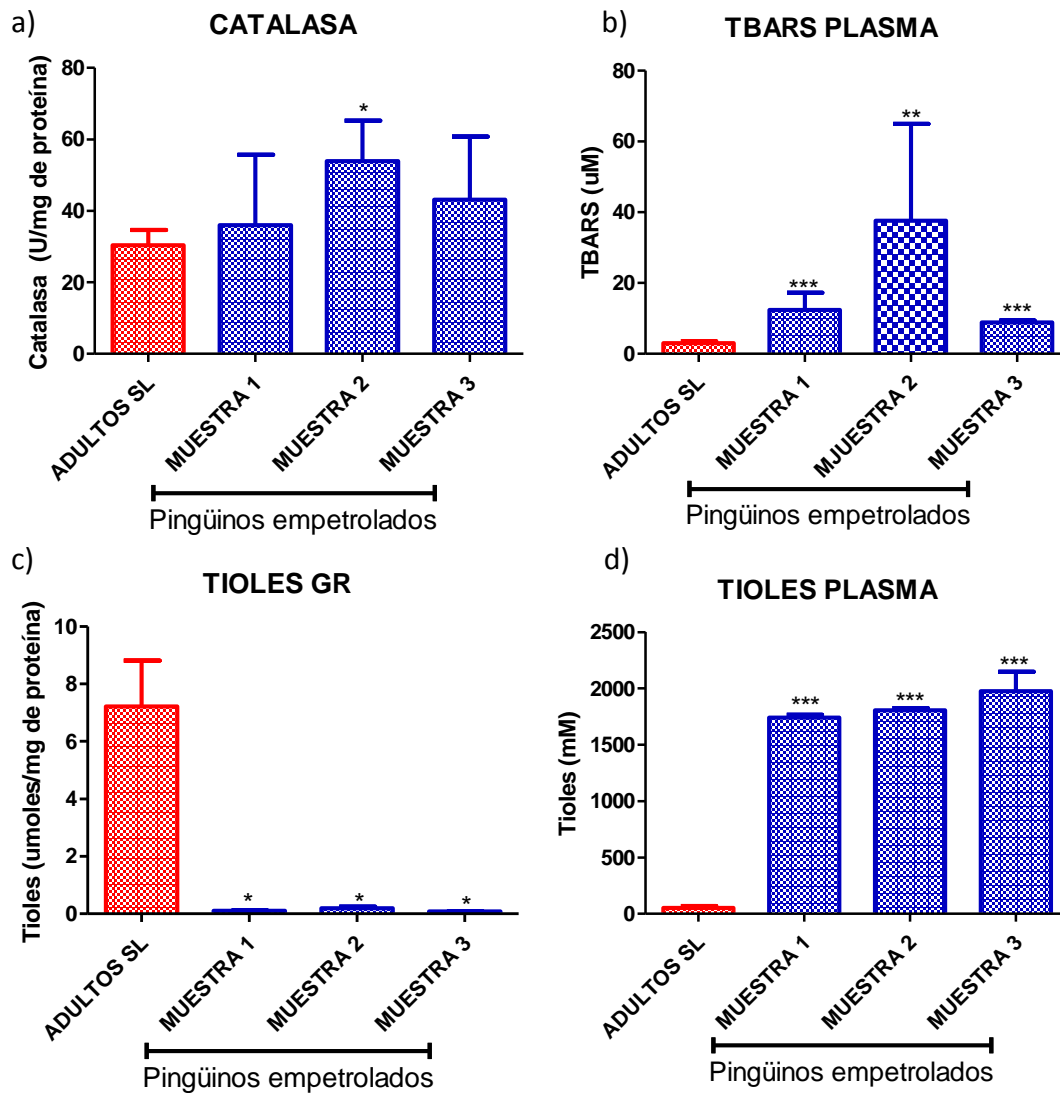


Fig. 4.6 Comparación de parámetros de estrés oxidativo entre pingüinos considerados sanos y pingüinos empetrolosados (1°, 2° y 3° toma de muestra): a) Actividad de la catalasa (U/mg de proteína), b) Tioles totales no proteicos en plasma (mM), c) Tioles totales no proteicos en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteína), d) TBARS en plasma (µM). T-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$).**

Tabla 4.1 Parámetros hematológicos, morfométricos y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes

Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo	Pingüinos empetroados 1 ^{ra} toma	Pingüinos empetroados 2 ^{da} toma	Pingüinos empetroados 3 ^{ra} toma	Pingüinos considerados sanos (colonia SL)
Leucocitos totales	79.7±12.2 (n=3)	66.7±12.1 (n=3)	79.7±12.2 (n=3)	58.3±2.8 (n=32)
H/L	4.7±0.8 (n=3)	3.6±0.2 (n=3)	4.7±0.8 (n=3)	1.3±0.1 (n=32)
Hematocrito	47.7±3.3 (n=3)	43.8±1.0 (n=3)	47.7±3.3 (n=3)	36.2±2.6 (n=27)
Glucosa	210±23.7 (n=3)	154.7±10.8 (n=3)	210.7±23.7 (n=3)	160.6±4.7 (n=27)
Proteínas totales	6.8±0.4 (n=3)	8.2±0.7 (n=3)	7.4±0.6 (n=3)	6.2±0.2 (n=27)
Peso (Kg)	3.6±0.8 (n=3)	4.6±0.5 (n=3)	4.5±0.5 (n=3)	3.9±0.1 (n=31)
Catalasa	35.9±19.8 (n=3)	53.9±11.3 (n=3)	43.2±17.6 (n=2)	30.4±4.3 (n=8)
TBARS plasma	12.4±4.8 (n=2)	37.7±27.3 (n=2)	8.9±0.5 (n=3)	3.0±0.5 (n=12)
Tioles GR	0.107±0.010 (n=3)	0.197±0.059 (n=3)	0.075±0.003 (n=3)	7.221±1.594 (n=8)
Tioles plasma	1740±25.8 (n=3)	1806±19.8 (n=3)	1977±170.6 (n=3)	51.3±19.1 (n=8)

n

Se muestra el promedio ± el desvío estándar y el tamaño muestral (n) para pingüinos de Magallanes. Los parámetros medidos fueron los leucocitos totales, la razón heterófilos/linfocitos (H/L), el hematocrito (%), la glucosa (mg/dl), las proteínas totales (g/dl), la actividad de la catalasa (U/mg de proteína), los niveles de tioles en plasma (mM) y tioles en glóbulos rojos (Tioles GR) (nmoles/mg de proteína), las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma (µM) y el peso (Kg).

DISCUSIÓN 4

Los pingüinos son vulnerables a los derrames de petróleo dado que nadan a poca profundidad, deben emerger para respirar y es probable que no puedan detectar ni evitar el petróleo que flota en la superficie del agua. Los pingüinos empetrolados, pierden inmediatamente la capacidad aislante de su plumaje y al bajar su temperatura corporal, se ven obligados a buscar refugio en las playas donde finalmente mueren por inanición. También se intoxican al ingerir petróleo intentando limpiar su plumaje (Bertellotti 2013). La mortalidad de pingüinos causada por el empetrolamiento es un problema de gran escala geográfica y larga data (García Borboroglu y Col. 2008).

El empetrolamiento ha causado la muerte de miles de pingüinos en diferentes lugares como África, América del Sur, Antártica, Australia y Nueva Zelanda (Dann 2007; Underhill 2007). En la costa patagónica los pingüinos de Magallanes son afectados tanto por grandes derrames como por contaminación crónica. Se han registrado grandes derrames, produciendo una masiva mortalidad en los animales. Uno de ellos, de origen desconocido, que llegó a las costas de Bahía Bustamante (Chubut, Argentina) en 1981, afectando un sector costero donde se encuentran ocho colonias insulares de la especie con una población estimada en 25100 parejas reproductivas (García Borboroglu y Col. 2002). El número de pingüinos afectados nunca fue estimado, pero se hallaron pingüinos empetrolados a lo largo de un extenso sector costero durante varias semanas, y aún se observan mantos de petróleo seco en las costas. En 1982, se registraron 500 pingüinos empetrolados en Punta Tombo; en 1991, otro derrame de origen desconocido provocó la muerte de al menos 17000 pingüinos en el centro de la Provincia de Chubut (Boersma y Col. 2007). En ese mismo año, se reportó un derrame en las inmediaciones de Bahía Melo (F. Fauring, comunicación personal). En 2006, alrededor de 400 pingüinos sufrieron empetrolamiento por un derrame de origen no establecido cerca de Cabo Vírgenes, Santa Cruz, Argentina (NGS 2006). En diciembre de 2007 un derrame en Caleta Córdova (Chubut), afectó al menos 300 pingüinos en la zona inmediata al derrame, observándose también pingüinos empetrolados en colonias insulares del norte del Golfo San Jorge,

estimándose preliminarmente una mortalidad de alrededor de 1500 pingüinos para este sector costero.

Los derrames de petróleo u otros hidrocarburos pueden no producir la muerte inmediata de los individuos afectados, sobre todo cuando estos eventos son leves. Sin embargo, los animales expuestos podrían estar incorporando a su organismo pequeñas cantidades de estas sustancias, con impactos crónicos en el estado fisiológico y la salud.

Para el caso de los pingüinos analizados en esta tesis, a su arribo, en la primera toma de muestra, las aves mostraron mayores valores de proteínas totales y menores niveles de glucosa, en comparación con los valores reportados para otros pingüinos de Magallanes empetrolados encontrados en la costa de Mar del Plata (Canepuccia y Col. 1999). Esto podría deberse a que el grado de contaminación con petróleo de los pingüinos en este estudio fue menor que en los pingüinos reportados por Canepuccia y Col. (1999). La glucemia, podría aumentar con el grado de empetrolamiento como un medio para afrontar los efectos que produce en los animales, incluyendo la pérdida de aislación de las plumas y la intoxicación por ingesta directa.

El peso de los pingüinos empetrolados que arribaron a Punta Tombo, fue similar al peso normal (entre 3.5 y 4 kg) reportado para los pingüinos de Magallanes (Bertellotti 2013) y para los animales considerados sanos estudiados en esta tesis (Tabla 4.1). En este sentido, los individuos de este estudio no estarían manifestando problemas nutricionales tales como los descritos en Canepuccia y Col. (1999), lo que también se refleja en los valores más altos de proteínas totales.

Los tres pingüinos empetrolados a su ingreso mostraron valores hematológicos (excepto para hematocrito y proteínas totales) y de estrés oxidativo (excepto la actividad de enzima catalasa y tioles en glóbulos rojos) mayores en comparación con pingüinos de Magallanes muestreados en la colonia de San Lorenzo (SL), (Tabla 4.1; Carabajal datos de esta tesis). Los valores de los pingüinos de la colonia SL, se pueden considerar de referencia para la especie en la zona central patagónica. En este sentido, se podría suponer que el costo energético que implica la contaminación, por mínima que sea, es alta para los animales.

Esto se manifiesta en una mayor glucemia y un aumento en la inversión en inmunidad, ya que la producción de leucocitos totales en sangre fue mayor. Finalmente, la situación se traduce en un mayor estrés fisiológico que se refleja en un índice H/L mayor en los pingüinos empetrolados.

Los valores de proteína totales fueron similares en los pingüinos empetrolados y en los pingüinos de la colonia de SL. Esto puede deberse a que las proteínas totales reflejan el almacenamiento de nutrientes que se incorporan con el alimento (Brown 1996) y, como se explicó previamente, los pingüinos no se encontrarían en pobre estado nutricional.

En relación a los parámetros de estrés oxidativo evaluados, se observaron en plasma de los pingüinos empetrolados aumentos en los niveles de TBARS, comparados con los animales de SL. Las ERO poseen elevado poder oxidante, afectando membranas celulares y macromoléculas. La determinación de TBARS en plasma se emplea como indicador directo del daño celular y de la peroxidación lipídica producida por el aumento de las ERO, que puede asociarse a una reducción de las actividades de las enzimas antioxidantes (Ortiz de Urbina y Col. 2004). También se encontraban mayores niveles de tioles en plasma en los animales empetrolados, el glutatión es el tiol no protéico más abundante y ayuda a proteger las células de las ERO como los radicales libres y los peróxidos (Chihuailaf y Col. 2002). De esta manera, que este aumento podría deberse a un intento de contrarrestar el estrés oxidativo producido por la intoxicación por la ingesta del petróleo, cuando las aves intentan limpiarse las plumas.

Por otra parte se registraron menores niveles de tioles en glóbulos rojos comparados con los valores de los pingüinos de la colonia SL (Tabla 4.1). Pero no se observaron cambios en los niveles de la actividad de la catalasa.

Desde la entrada al centro de rehabilitación y luego del lavado, donde los tres pingüinos sufrieron alteraciones en algunos de los parámetros medidos, los valores tendieron a parecerse a la primera toma hacia el final de la rehabilitación (Fig. 4.3 y 4.2). Entre la 2da y la 3ra toma de muestras, los valores de catalasa y TBARS, mostraron una disminución

tendiente a acercarse a los valores considerados normales para esos parámetros (Tabla 4.1).

Sin embargo, los valores de leucocitos totales y el índice H/L fueron más bajos en la 2da toma y luego aumentaron en la 3ra. Esto puede deberse al estrés producido por la manipulación durante el lavado de los pingüinos, que sucedió entre la 2da y 3ra toma de muestras (Carabajal datos de esta tesis).

Aunque algunas variables para cada pingüino se comportaron diferentes durante el tratamiento, en general se observó una tendencia a normalizarse hacia el momento de su liberación. De esta manera, se puede concluir que los pingüinos se liberaron en buen estado físico luego de la rehabilitación. Es importante destacar que la cuantificación de los parámetros hematológicos y de estrés oxidativo es una herramienta útil para ecotoxicólogos y ecofisiólogos para evaluar el impacto de contaminantes y las situaciones de estrés en especies marinas.

Conclusión final y perspectivas



CONCLUSIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS

Numerosos trabajos demuestran la utilidad de estudiar a las aves como bioindicadores de contaminación ambiental (Ek y Col. 2004; Nam y Lee 2006; Swaileh y Sansur 2006; Pan y Col 2008; Naccari y Col. 2009). Esto es debido a que las mismas están ampliamente distribuidas, son sensibles a cambios del ambiente y ocupan distintos niveles tróficos en los ecosistemas, permitiendo así monitorear la salud ambiental del ecosistema en el que habitan. Al igual que otros organismos, las aves son sensibles a los efectos de los metales pesados y otros contaminantes, ya que éstos pueden impactar negativamente el sistema inmune y endócrino, causar disfunciones reproductivas, entre otras.

Las colonias reproductivas de los pingüinos de Magallanes distribuidas a lo largo de la costa patagónica enfrentan diferentes presiones ambientales tanto naturales como producto de las actividades del desarrollo humano. Es una de las especies más afectada por la contaminación por hidrocarburos (Gandini y Col. 1994; Boersma 1995; Bertellotti 2013) a la vez que, por sus características carismáticas, es atractiva para el turismo, actividad de valiosa importancia en la región y cada vez más desarrollo (Bertellotti y Col. 2013).

En este contexto, resulta de vital relevancia determinar y describir los niveles normales (funcionales) de los parámetros fisiológicos (hematológicos y de estrés oxidativo) para los pingüinos de Magallanes que anidan en las costas patagónicas, con el propósito de llegar a identificar, describir y cuantificar su relación con los factores antropogénicos y las potenciales alteraciones fisiológicas. Además, se debe tener en cuenta las diferencias en el sexo, la etapa reproductiva, edad, zona de anidación, etc. (Kloskowski y Col. 2017) para obtener resultados confiables.

Los hallazgos que surgen de este trabajo de tesis contribuyen por un lado a proporcionar valores de referencia de parámetros de estrés oxidativo y hematológicos para la especie *Spheniscus magellanicus*, dado que la gran mayoría de ellos no han sido determinados hasta el momento. Por otro lado, permitirán identificar posibles indicadores de cambios

fisiológicos que podrían alertar sobre el estado de los individuos aún antes de que estos afecten negativamente su capacidad reproductiva o su supervivencia, permitiendo así la detección temprana del problema y realizar las medidas necesarias para aminorarlo (Carey 2005; Wikelski y Cooke 2006). La determinación, no invasiva, en sangre de varios tipos de parámetros biológicos permite generar una mejor interpretación de la respuesta metabólica a alteraciones ambientales, permitiendo una evaluación más confiable del estado de salud del ave previo a observar los efectos a nivel ecológico y poblacional.

Dado que estudios de investigación que evalúan a las aves silvestres como bioindicadores de contaminación ambiental, demostraron que pueden existir diferencias significativas en parámetros hematológicos entre sexo, grupos etarios y especies de aves, en este trabajo de tesis se estudiaron los mismo teniendo en cuenta la edad, sexo y colonia o sitio geográfico de los pingüinos de Magallanes.

En este estudio se describen las características hematológicas y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes que anidan en la colonia San Lorenzo (SL) y la colonia Isla Quiroga (IQ), teniendo en cuenta la edad y el sexo, información que no se había reportado al momento. Estos hallazgos podrán ser utilizados como línea de referencia para trabajos posteriores, pudiendo ser utilizados por investigadores para evaluar la salud de las poblaciones y posibles cambios por alteraciones del ambiente.

Asimismo, a pesar de no encontrar cambios significativos en los parámetros hematológicos estudiados, se observaron niveles significativamente mayores de ROMs, indicador de daño oxidativo, en individuos sometidos a presión turística en los pingüinos que anidan en la colonia SL. Esto podría indicar que los estudios de marcadores de estrés oxidativo podrían ser más sensibles para determinar posibles alteraciones fisiológicas en poblaciones de animales silvestres.

Por otra parte, la comparación de los parámetros estudiados en pingüinos de distintas colonias indica que, en adultos de ambos sexos, se observan mayores niveles de peroxidación lipídica y menores niveles de antioxidante en plasma en animales de IQ comparados con los aquellos considerados sanos (colonia SL). Esto podría reflejar el daño

oxidativo producido por la exposición crónica a contaminantes. Sin embargo, los pichones son los que presentan mayores diferencias en los parámetros evaluados entre los pingüinos de la colonia IQ y SL. Contrariamente a lo observado en adultos, se registran menores niveles de TBARS en sangre de pichones de IQ que pueden estar asociados a los mayores niveles de antioxidantes observados. Esto podría representar una estrategia celular para compensar el daño producido por contaminantes.

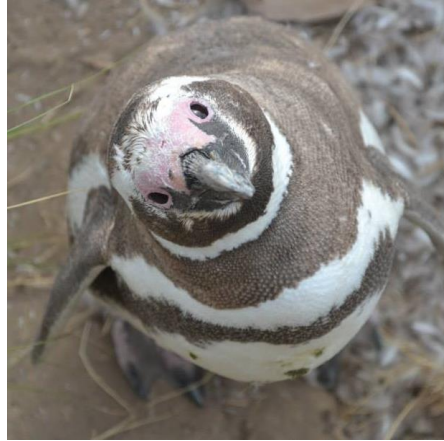
Hay que tener en cuenta, que las colonias de pingüinos de Magallanes que se distribuyen a lo largo de toda la costa patagónica están sujetas a diferentes presiones de origen humano. Los efectos ambientales pueden actuar sinérgicamente con estas presiones, disminuyendo aún más la condición física de los individuos. Estos efectos serán mayores en colonias más grandes y en contextos de altas densidades, debido a los efectos densodependientes (competencia por el alimento, competencia por los mejores sitios de nidificación). De esta manera, los resultados deben analizarse con cautela y evaluar el contexto donde habitan los animales.

Por primera vez, se analizaron parámetros de estrés oxidativo y hematológicos en los pingüinos de Magallanes silvestres en las colonias estudiadas, la cuantificación de estos parámetros puede resultar una herramienta útil para ecotoxicólogos y ecofisiólogos al evaluar el impacto de contaminantes y situaciones de estrés en especies marinas silvestres.

Sin embargo, son necesarios nuevos estudios que proporcionen información acerca de los efectos antropogénicos, y sería recomendado estudiar los tipos de contaminantes (como metales pesados, niveles de hidrocarburos, entre otros) en el ambiente, incorporar técnicas complementarias, aumentar el tamaño de la muestra y estudiar otras colonias para confirmar la utilidad de estos parámetros como bioindicadores. Es importante remarcar que estamos ante un campo de estudio prácticamente inédito puesto que son muy escasos los trabajos publicados.

Los resultados de la presente tesis no sólo enriquecen el conocimiento científico acerca del impacto de diferentes presiones ambientales en los pingüinos de Magallanes, sino que proyecta además su transferencia al medio local para la elaboración de adecuadas pautas de manejo y conservación. Por ejemplo, proponiendo el uso de estos bioindicadores para la planificación responsable de actividades turísticas en diferentes colonias o incluso en diferentes áreas dentro de las colonias. Pretende así lograr el manejo responsable definiendo normas que minimicen el impacto de la contaminación o el turismo. De este modo aportará beneficios ambientales, económicos y sociales a la región.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 2004;10:141-147.
- Agnew D.J., Kerry K.R. Sexual dimorphism in penguins. *The penguins: ecology and management.* Dann P., Norman I. y Reilly P., eds. Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, N.S.W., Australia. 1995;299-318.
- Alonso Alvarez C., Munilla I., López M., Velando A. Sublethal toxicity of the Prestige oil spill on yellow-legged gulls. *Environment International.* 2007;54:773-781.
- Altamirano González-Ortega M.A., Guzmán Hernández J., Martín Gómez M. F., Domínguez Velázquez L.E. Un método para la selección de aves bioindicadoras con base en sus posibilidades de monitoreo. *Mexicana de Ornitología.* 2003;4,(2):10-16.
- Anselstetter V., Heimpel H. Acute hematotoxicity of oral benzo(a)pyrene: the role of the Ah locus. *Acta Hematológica Basel.* 1986;76:217-223.
- Auffret M., Duchemin M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Moraga D., Marhic A. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the "Erika" oil spill. *Aquatic Living Resource.* 2004;17:297-302.
- Balseiro A., Espí A., Márquez I., Pérez V., Ferreras M.C., García Marín J.F., Prieto J.M. Pathological features in marine birds affected by the Prestige's oil spill in the North of Spain. *Journal of Wildlife Diseases.* 2005;41:371-378.
- Barrionuevo M., Frere E. Parental investment in eggs and its effect on nestling growth and survival in Magellanic Penguins. *Csiro publishing.* 2015.
- Beaulieu M., Ropert-Coudert Y., Le Maho Y., Ancel A., Criscuolo F. Foraging in an oxidative environment: relationship between $\delta^{13}\text{C}$ values and oxidative status in Adélie penguins. *Proceedings. Biological sciences.* 2010;277,(1684):1087-92.

-
- Beaulieu M., Thierry A.M, González-Acuña D., Polito M.J. Integrating oxidative ecology into conservation physiology. 2013;1.
 - Beaulieu M., Costantini D. Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conserv Physiol*. 2014;2,(1).
 - Berglund A.M.M., Sturve J., Förlin L., Nyholm N.E.I. Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in northern Sweden. *Environ Res*. 2007;105:330-339.
 - Bergmeyer H.V., Bowers G.N.J., Horder M., Moss D.W. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chim Acta*. 1976;70,(2):19-29.
 - Bergmeyer H.V., Horder M. IFCC methods for measurement of catalytic concentrations of enzymes. *Clin Chim Acta*. 1980;105:147-172.
 - Bertellotti M., Tella J.L., Godoy J.A. Blanco G., Forero M., Donázar J.A., Ceballos O. Determining Sex of Magellanic Penguins Using Molecular Procedures and Discriminant Functions. *Waterbirds*. 2002;25:479-484.
 - Bertellotti M. Pingüino de Magallanes, embajador de la Patagonia. Vázquez Mazzini Editores. 2013;9132.
 - Boersma P.D., Stokes D.L., Yorio P.M. Reproductive variability and historical change of Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Punta Tombo, Argentina. *Penguin Biology*. Academic Press. 1990;15-43.
 - Boersma P.D., Williams T.D. Magellanic penguin. *The penguins* Oxford University Press. 1995;249-258.
 - Boersma P.D. Penguins as marine sentinels. *Bio Science*. 2008;58(7):597-608.

- Bogetti R., Lopes X. Relevamiento turístico de la comarca atlántica del río Deseado. Ediciones Independientes. 2008:115.
- Boswall J., MacIver D. The Magellanic Penguin *Spheniscus magellanicus*. The biology of penguins. 1975;271-305.
- Bouda J., Quiroz-Rocha G.F., Sánchez Ramírez E., Esquivel Peña J., Dávalos Flores J.L. Selected biochemical values in blood plasma of ostriches of different age and sex. Veterinaria México. 2004;35,(1).
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72:248-254.
- Brown M. Assessing Body Condition in Birds. Nolan Jr. V, Ketterson, E.D. eds. Current Ornithology. 1996;13,(3):67-135.
- Buettner G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. Arch Biochem Biophys. 1993;300:535-543.
- Burger J. Metals in avian feathers: bioindicators of environmental pollution. Reviews in Environmental Toxicology. 1993;5:203-311.
- Burger J., Gochfeld M. Marine birds as sentinels of environmental pollution. Eco Health. 2004;1:263-274.
- Campbell T.W. Avian Hematology and Cytology. Iowa State University Press Ames Iowa. 1995.
- Canepuccia A.D., Meligeni C.D., Verdun R. Estudios sobre los efectos de la contaminación por petróleo en sangre del pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*). XIX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 1999.

- Carabajal E., D'Amico V., Medina V., Bertellotti M. Parámetros hematológicos y de estrés oxidativo en pingüinos de Magallanes rehabilitados por contaminación con petróleo. *Acta Toxicológica Argentina*. 2016,24(2):87-96.
- Carey C. How physiological methods and concepts can be useful in conservation biology. *Integrative and Comparative Biology*. 2005;45:4-11.
- Castillo Torres J.M. Determinación de valores de referencia para hematología, química sérica, fisiología y morfometría del águila mora (*Geranoaetus melanoleucus*) en zoológicos de la región interandina de Ecuador. Universidad Nacional de Loja, área agropecuaria y de recursos naturales renovables. 2015.
- Cevasco C.M, Frere E., Gandini P.A. Intensidad de visitas como condicionante de la respuesta del pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) al disturbio humano. *The Neotropical Ornithological Society*. 2001;12:75-81.
- Chance B. Special methods: catalase. In *methods of biochemical analysis*. D Glick R. Interscience New York. 1954;408-424.
- Chihuailaf R.H., Contreras P.A., Wittwer F.G. Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM*. 2002;33,(3):266-279.
- Código de Núremberg. Tribunal Internacional de Núremberg, 1947. Traducción adaptada de Mainetti J.A. *Ética médica*, Quirón, La Plata, Argentina.1989.
- Colombini M., Alderete S., Musmeci J.M., Caille G., Harris G., Esteves J.L. 2º Censo Nacional de Contaminación Costera de la República Argentina. Proyecto "Consolidación e Implementación del Plan de Manejo de la Zona Costera Patagónica para la Conservación de la Biodiversidad". Fundación Patagonia Natural. 2008.

- Colominas-Ciuró R., Bertellotti M., Carabajal E., D'Amico V., Barbosa A. Incubation induces high oxidative costs compared to chick rearing in a seabird, the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Marine Biology*. 2017;164:1-8.
- Coraiola A.M. Indicadores clínicos, hematológicos, bioquímicos e toxicológicos na pré e pós-reabilitação de pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no sul do Brasil. Universidad de Federal Do Paraná. 2012
- Costantini D. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters*. 2008;11:1238-1251.
- Costantini D., Bonadonna F. Patterns of variation of serum oxidative stress markers in two seabird species. *Polar Research*. 2009:30-35.
- Costantini D., Verhulst S. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress?. *Functional Ecology*. 2009:506-509.
- Costantini D. Redox physiology in animal function: The struggle of living in an oxidant environment. *Current Zoology*. 2010;56(6):687-702.
- Costantini D. Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology. *A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches*. 2014.
- Custer T.W., Custer C.M., Hines R.K., Sparks D.W. Trace elements organochlorines, polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins and furans in lesser scaup wintering on the Indiana Harbor Canal. *Environmental Pollution*. 2000;110:469-482.
- D'Amico V.L., Bertellotti M., Diaz J.I., Coria N., Vidal V., Barbosa A. Leucocyte levels in some antarctic and non-antarctic penguins. *Ardeola*. 2014;61,(1):145-152.
- Davico C., Poletta G.L., Loteste A., Scagnetti J.A., Campana M., Parma M.J., Simoniello M.F. Evaluación de estrés oxidativo en juveniles de *Prochilodus lineatus* expuestos a cipermetrina. *FABICIB*. 2012;16:157-166.

- Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates. A review for ecologists. *Functional Ecology*. 2008;22:760-77.
- Davis L.S., Renner M. *Penguins*. 2003
- Declaración de Helsinki y sus modificaciones, declaración universal sobre genoma humano y derechos humanos aprobada por la conferencia general de la UNESCO, del 11/11/1997). *Bioética*. El desafío de una declaración universal. Ministerio de justicia y derechos humanos de la Nación Argentina. 2007. Disponible en: http://www.jus.gob.ar/media/1038872/publicacion_08-dhpt-bioetica_desafio.pdf.
- Díaz C., Rodríguez M.M, Fresneda M., Bisset J.A. Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. *Cubana Med Trop*. 2004;56,(2).
- Dowling D.K, Simmons L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc Biol Sci*. 2009;276,(1663):1737-1745.
- Ek K.H., Morrison G.M., Lindberg P., Rauch S. Comparative tissue distribution of metals in birds in sweden using ICP-MS and laser ablation ICP-MS. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2004;47:259-269.
- Ellenberg U., Mattern T., Seddon P.J., Jorquera G.L. Physiological and reproductive consequences of human disturbance in Humboldt penguins: The need for species-specific visitor management. *Biological Conservation*. 2006;133:95-106.
- Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2001;1:529-539.
- Esteves J.L., Gil M., Commendatore M., Santinelli N., Sastre V, Solís M., Ocariz H., González Raies C. Evaluación de la contaminación urbana en la Ría de Deseado (Provincia de Santa Cruz). Informe técnico N° 36. 1997.

- Forero G.M., Hobson K.A., Bortolotti G.R., Donázar J.A, Bertellotti M., Blanco G. Food resource utilisation by the Magellanic penguin evaluated through stable-isotope analysis: segregation by sex and age and influence on offspring quality. *Manuela G. Marine Ecology Progress Series*. 2002;234:289-299.
- Fossi M.C. Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 1994;102,(12):49-54.
- Fowler G.S., Wingfield J.C., Boersma P.D. Hormonal and reproductive effects of low levels of petroleum fouling in the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Auk*. 1995;112:382-389.
- Frere E., Gandini P., Boersma P.D. Aspectos particulares de la biología de reproducción y tendencia poblacional del Pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) en la colonia de Cabo Vírgenes, Santa Cruz, Argentina. *Hornero*. 1996;14:50-59.
- Frere E., Gandini P., Boersma P.D. The breeding ecology of Magellanic Penguins at Cabo Virgenes, Argentina: What factors determine reproductive success?. *Colonial Waterbirds*. 1998;21:205-210.
- Fudge A.M. Avian clinical pathology, hematology and chemistry, in altman, clubb, dorrestein, quesenberry. *Avian Medicine and Surgery*. 1997:142-157.
- Fudge AM. *Laboratory Medicine. Avian and Exotic pets*. Saunders Company. 2000
- Fundación Patagonia Natural. Proyecto: prevención de la contaminación costera y gestión de la diversidad biológica marina Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable Dirección de Recursos Ictícolas y Acuícolas. 1999.
- Gálvez Martínez C.F, Ramírez Benavides G.F., Osorio J.H. El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas. *Biosalud*. 2009;8:178-188.

- Gandini P., Boersma P.D., Frere E., Gandini M., Holik T., Lichtschein V. Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) affected by chronic petroleum pollution along the coast of Chubut, Argentina. *Auk*. 1994;111:20-27.
- Gandini P., Frere E. Plan para el uso turístico recreativo de las colonias de aves de la Ría Deseado e Isla Pingüino, Santa Cruz. Plan de manejo integrado de la zona costera Patagónica. Informe técnico N°18. 1996.
- García Borboroglu P., Yorio P., Boersma P.D, Del Valle H., Bertellotti M. Habitat use and breeding distribution of Magellanic penguins in northern San Jorge Gulf, Patagonia, Argentina. *The Auk*. 2002;119,(1):233-239.
- García Borboroglu P., Boersma P.D, Reyes L.M., Ruoppolo V. Contaminación por hidrocarburos y su efecto sobre el pingüino de Magallanes. Estado de Conservación del Mar Patagónico. 2008.
- García M.A. Utilidad de medición de transaminasas como indicadores de enfermedad hepática en distintas especies exóticas. 51 Congreso Nacional Avepa. 2016.
- García Tarrasón M., Sanpera C., Jover L., Costantini D. Levels of antioxidants in breeding female Audouin's gulls and their deposition in eggs across different environments. *Experimental Marine Biology and Ecology*. 2014;453:116-122.
- Ghebremeskel K., Williams G., Keymer I.F., Horsley D.I., Gardner D.A. Plasma chemistry of Rockhopper (*Eudyptes crestatus*), Magellanic (*Spheniscus magellanicus*) and Gentoo (*Pygoscelis papua*) wild penguins in relation to moult. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1989;92,(a):43.
- Giese M. Effects of human activity on Adelie penguin *Pygoscelis adeliae* breeding success. *Biological Conservation*. 1996;75:157-164.

- Gil F., Pla A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 2001;21:245-255.
- Golet G.H., Seiser P.E., Mc Guire A.D., Roby D.D., Fischer J.B., Kuletz K.J., Irons D.B., Dean T.A., Jewett S.C., Newman S.H. Long-term direct and indirect effects of the Exxon Valdez oil spill on pigeon guillemots in Prince William Sound, Alaska. *Marine Ecology Progress Series.* 2002;241:287-304.
- Götmark F. The effects of investigator disturbance on nesting birds. In 'D. Power'. Plenum Press: 1992;63-104.
- Green A.J., Figuerola J. Aves acuáticas como bioindicadores en los humedales. *Ecología, manejo y conservación de los humedales.* 2003;47-60.
- Gross W., Siegel H.S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.* 1983;27:972-079.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione-S-Transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry.* 1974;249:7130-39.
- Hale K.A., Briskie J.V. Decreased immunocompetence in severely bottlenecked population of an endemic New Zealand bird. *Animal Conservation.* 2007;10:2-10.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Clarendon Press, Oxford. 2007;4.
- Haratym-Maj A. Hematological alterations after pyrethroids poisoning in mice. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2002;9:199-206.
- Hernández Betancourt O., Fernández Torres S., Vázquez Reyes N., Leiva Quesada L., Falcón Almeida Y., Torres Romo U. Stability of a multienzyme control serum used as reference material in clinical laboratories. *Cubana de Investigaciones Biomédicas.* 2012;31,(2):226-242.

- Hernández-Muñoz R., Glender W., Díaz-Muñoz M., García-Sáinz J.A., Chagoya de Sánchez V. Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*. 1984;33,(16):2599-2604.
- Herrera-Deñás A., Pineda J., Antonio M., Aguirre J. Oxidative stress of House Sparrow as bioindicator of urban pollution. *Ecological Indicators*. 2013;42:6-9.
- Hochleithner M. *Biochemistries In: Ritchie, B.W., Harrison G.J., Harrison L. R. Avian medicine: principles and application*. Lake Worth: Wingers Publishing. 1994:176-198.
- Hoffman D.J., Spalding M.G., Frederick P.C. Subchronic effects of methylmercury on plasma and organ biochemistries in great egret nestlings. *Environ Toxicol Chem* 2005;24:3078-3084.
- Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002;30,(6):620-650.
- Koivula M.J, Eeva T. Metal-related oxidative stress in birds. *Environ Pollut*. 2010;158,(7):2359-70.
- Laffon B., Fraga-Iriso R., Pérez Cadahía B., Méndez J. Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil contaminated birds. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44:1714-1723.
- Lima E.S., Abdalla D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2001;37,(3):293-303.
- Limón-Pacheco J., Gonsebatt M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*. 2009;674,(1-2):137-47.

- Llesuy S., Ferreira S., Boveris A., Evelson P., Reppeto M., Reides C., Magnani N., Marchino T., Semprine J., Musacco Sebio R. Metodología para la evaluación de estrés oxidativo en patologías humanas. Laboratorio de Estrés Oxidativo en Patologías Humanas de la Cátedra de Química General e Inorgánica de la FFyB, UBA. 2012.
- Martin I., Grotewiel M.S. Oxidative damage and age-related functional declines. *Science Direct*. 2006;127,(5)411-423.
- Martinez-Haro M., Green A., Mateo R. Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field. *Environmental Research*. 2011;111,(4):530-538.
- Martínez Rivarola M., Campagna C., Tagliorette A., Losano P. Impacto del avistaje de ballenas en Península Valdés. Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. Fundación Patagonia Natural (Puerto Madryn). 1996;28:1-48.
- Masnatta L., Fischer P., Dominguez G., Cabrera Fischer E., Ramirez A., Sanchez R. Marcadores de estrés oxidativo. Su valor en la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular en el Hospital de Día. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*. 2003;32:177-183.
- Mateo R., Beyer W.N., Spann J.W., Hoffman D.J., Ramis A. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*. 2003;66:1371-1389.
- Maxwell M.H. Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poult. Sci. J.* 1993;49,34-43.
- Metcalfe N.B., Alonso-Alvarez C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*. 2010;24:984-996.

- Meyer D.J, Harvey J.W. El laboratorio en medicina veterinaria, interpretación y diagnóstico. Intermedica Bs. As. 2000:83.
- Milei J., Forcada P., Fraga C., Grana D., Tritto I., Jannelli G., Chiariello M., Ambrosio G. Lipoperoxidación de membranas y daño ultraestructural por estrés oxidativo en isquemia-reperfusión miocárdica. Revista Argentina de Cardiología. 2006;74:12-18.
- Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972;247,(10):3170-3175.
- Monaghan P., Metcalfe N., Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. Ecology Letters. 2009;12:75-92.
- Moreno-Salas L., Nilsson- Saéz L., Corvalán F., Ardiles-Villegas K., Merino-Muñoz V., Islas-Letelier A., González-Acuña D. Hematological and Blood Biochemical Values in Wild and Captive Penguin Humboldt *Spheniscus humboldti* (*Sphenisciformes: Spheniscidae*). FCV- LUZ / Vol. XXIV. 2014;3:267-271.
- Naccari C., Cristani M., Cimino F., Arcoraci T., Trombetta D. Common buzzards (*Buteo buteo*) bio-indicators of heavy metals pollution in Sicily (Italy). Environ Int. 2009;35:595-598.
- Nam D.H, Lee D.P. Monitoring for Pb and Cd pollution using feral pigeons in rural, urban, and industrial environments of Korea. Sci Total Environ. 2006;375:288-295.
- NATIONAL GEOGRAPHIC SOCIETY NEWS. http://news.nationalgeographic.com/news/2006/06/060616-penguins_2.html. 2006.
- Newman S.H., Anderson D.W, Ziccardi M.H, Trupkiewicz J.G., Tsengd F.S, Christopher M., Zinkl J.G. An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated American coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. Environmental Pollution. 2000;107:295-304.

- Newton I., Wyllie A.A. Mortality from the pesticides aldrin and dieldrin in British Sparrowhawks and Kestrels. *Ecotoxicology*. 1992;1:31-44.
- Nisbet I.C.T. Disturbance, Habituation, and Management of Waterbird Colonies. *Waterbirds*. 2000;23:312-332.
- Ochoa D.M., Gonzáles J.F. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Colombia. 2008;55:115-126.
- Olrog C. Distribución geográfica del *P. pennata*, 1984. Cría de Avestruces, emúes y ñandúes. Real Escuela de Avicultura. 1997;2.
- Oropesa A.L., Gravato C., Guilhermino L., Soler F. Antioxidant defences and lipid peroxidation in wild White Storks, *Ciconia ciconia*, from Spain. *J Ornithol*. 2013;154:971-976.
- Ortiz de Urbina J.J., Jorquera F., Culebras J., Villares C., González-Gallego J., Tuñón M.J. Effects of glutamine on antioxidants systems and hepatic detoxification in rats: influence of formulation. *Nutrición Hospitalaria*. 2004;2:73-82.
- Palomeque A. Química sanguínea y hemograma normal del avestruz, 1991. Cría de Avestruces, emúes y ñandúes. Real Escuela de Avicultura. 1997;2.
- Pan C., Zheng G., Zhang Y. Concentrations of Metals in Liver, Muscle and Feathers of Tree Sparrow: Age, Inter-Clutch Variability, Gender, and Species Differences. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2008;81:558-560.
- Pérez C., Lores M., Velando A. Availability of nonpigmentary antioxidant affects red coloration in gulls. *Behavioral Ecology*. 2008;19:967-973.
- Pérez-Rodríguez L., Romero-Haro A., Sternalski A., Muriel J., Mougeot F., Gil D., Alonso-Alvarez C. Measuring Oxidative Stress: The Confounding Effect of Lipid

Concentration in Measures of Lipid Peroxidation. *Physiological and Biochemical Zoology*. 2015;88,(3):1-7.

- Piatt J.F, Sydeman W.J. Seabirds as indicators of marine ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser*. 2007;352:199-204.
- Pinto E., Sigaud Kutner T.C.S., Leitão M.A.S., Okamoto O.S., Morse D., Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol*. 2003;39:1008-1018.
- Pozzi L., García-Borboroglu P., Boersma P., Pascual M. Population Regulation in Magellanic Penguins: What Determines Changes in Colony Size?. *Plos One*. 2015; 10;3.
- Racker E. Glutathione reductase from baker's yeast and beef liver. *J Biol Chem*. 1955;217(2):855-65.
- Raja-aho S., Kanerva M., Eeva T., Lehtikoinen E., Suorsa P., Gao K., Vosloo D., Nikinmaa M. Seasonal Variation in the Regulation of Redox State and Some Biotransformation Enzyme Activities in the Barn Swallow (*Hirundo rustica L.*). *Physiol Biochem Zool*. 2012;85,(2):148-158.
- Rebstock G.A., Boesma P.D. Parental behavior controls incubation period and asynchrony of hatching in Magellanic Penguins. *Condor*. 2011;113(2):316-325.
- Ritchie, B., G. Harrison and L. Harrison *Avian Medicine: Principles and Applications*. Wingers Publishing Inc. 1994.
- Rodríguez S.J. Los pingüinos: bioindicadores de la contaminación ambiental en la península Antártica e islas asociadas. Universidad de Murcia, Departamento de Ciencias Sociosanitarias. 2012.
- Romero M.B., Polizzi P., Chiodi L., Robles A., Rodríguez Heredia S., Gerpe M. Metallothionein and lipid peroxidation as markers to assess health status of

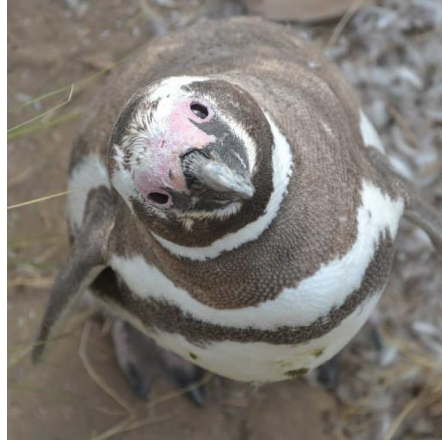
- chronically oiled Magellanic penguins in Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 2015;23,(1):15-24.
- Roomen, M., van Koffijberg, K., Noordhuis, R., Soldaat, L. Long-term waterbird monitoring in The Netherlands: a tool for policy and management, en: Boere, G.C., Galbraith, C.A., Stroud, D.A. (Eds.). *Waterbirds Around the World*. The Stationery Office, Edinburgh. 2006;463-470.
 - Sandhir R., Gill K.D. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 1995;48:91-97.
 - Seddon P., Ellenberg U. Effects of human disturbance on penguins: the need for site- and species-specific visitor management guidelines. *Marine Wildlife and Tourism Management: Insights from the Natural and Social Sciences*. 2007:163-181.
 - Selman C., Blount J.D., Nussey D.H., Speakman J.R. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends in Ecology and Evolution*. 2012;27,(10):570-577.
 - Sergenta N., Rogers T., Cunninghamb M. Influence of biological and ecological factors on hematological values in wild Little Penguins, *Eudyptula minor*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 2004;134:333-339.
 - Simon-Giavarotti K.A., Giavarotti L., Gomes L.F., Lima A.F., Veridiano A.M., Garcia E.A., Mora O.A., Fernández V., Videla L.A., Junqueira V.B.C. Enhancement of lindane-induced liver oxidative stress and hepatotoxicity by thyroid hormone is reduced by gadolinium chloride. *Free Radic. Res.* 2002;36:1033-1039.
 - Swaileh K.M., Sansur R. Monitoring urban heavy metal pollution using the House Sparrow (*Passer domesticus*). *J. Environ. Monit.* 2006;8:209-213.

- Swiergosz Kowalewska R., Bednarska A., Kafel A. Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere*. 2006;65:963.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem*. 1969;27,(3):502-22.
- Toplan S., Ozcelik D., Dariyerli N., Akyolcu M.C. Oxidant and antioxidant status of cadmium administered rats. *J. Physique IV (Proceedings)*. 2003;107:1309-1312.
- Travies E.K., Vargas F.H., Merkel J., Gottdenker N., Miller R.E, Parker P.G. Hematology, serum chemistry, and serology of Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galápagos Islands, Ecuador. *Journal of Wildlife Diseases*, Ames. 2006;42:625-632.
- Underhill L. Avian De mography Union. A brief history of penguin oiling in South African waters.htm . 2007
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160,(1):1-40.
- Vázquez-Medina, J. P., T. Zenteno-Savín, H. Jay, D. E. Crocker y R. M. Ortiz. Prolonged fasting increases glutathione biosynthesis in postweaned Northern elephant seals. *J. Exp. Biol*. 2011;214:1294-1299.
- Villanueva C. Evaluación del impacto de las visitas en una colonia reproductiva de pingüinos de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) en Península Valdés, Chubut, Argentina. Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche. 2012.
- Villanueva C., Walker G.W., Bertellotti M. A matter of history: effects of tourism on physiology, behaviour and breeding parameters in Magellanic Penguins

- (*Spheniscus magellanicus*) at two colonies in Argentina. *J Ornithol.* 2014;153:219-228.
- Villouta G., Hargreaves R., Rtvros V. Haematological and clinical biochemistry findings in captive Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*). *Avian Pathology.* 2007;26,(4):851-858.
 - Von Schantz T., Bensch S., Grahn M., Hasselquist D., Wittzell H. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London Series B.* 1999;266:1-12.
 - Wallace R. S., Teare A., Diebold E., Michaels M., Willis M.J. Hematology and plasma chemistry values in free-ranging humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Chile. *Zoo Biology, Brookfield.* 1995;14:311-316.
 - Weeks B.A., Anderson D.P., DuFour A.P., Fairbrother A., Goven A.J., Lahvis G.P., Peters G. Immunological biomarkers to assess environmental stress, in: *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. SETAC Special Publication Series.* 1992;211-234.
 - White K.L.J., Lysy H.H., Holsapple M.P. Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: a structure-activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacology.* 1985;9:155-164.
 - Wiese F., Ryan P. The extent of chronic marine oil pollution in southeastern Newfoundland waters assessed through beached bird surveys 1984-1999. *Marine Pollution Bulletin.* 2003;46,(9):1090-1101.
 - Wikelski M., Cooke S.J. Conservation physiology. *Trends in Ecology & Evolution.* 2006;21:38-46.
 - Williams T.D., Boersma P.D. Magellanic Penguin. In 'The Penguins: Spheniscidae'. Oxford University Press. 1995;249-258.

- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 1976;15(2):212-6.
- Yorio P., Boersma P.D. Causes of nest desertion during incubation in the Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*). *Condor.* 1994;96:1076-1083.
- Yorio, P., Gandini, P. y Frere, E. Disturbios humanos sobre las aves marinas: efectos sobre la reproducción y su relación con el manejo de visitantes a las colonias. Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. Fundación Patagonia Natural (Puerto Madryn, Argentina). 1996;23:1-18.
- Yorio P., García Borboroglu P., Potti J., Moreno J. Breeding biology of Magellanic Penguins *Spheniscus magellanicus* at Golfo San Jorge, Patagonia, Argentina. *Marine Ornithology.* 2001;29:75-79.

Abreviaturas



ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALT: Alanina transaminasa

ANOVA: Análisis de la varianza

AO: Antioxidantes

AST: Aspartato transaminasa

Bche: Pseudocolinesterasa

CDNB; 1-cloro-2,4 dinitrobenceno

cm: Centímetro

dl: Decilitro

d-ROM: Metabolitos del oxígeno reactivo

DTNB: Acido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico

EDTA: Ácido etilendiamino tetracético

EE.UU.: Estados Unidos

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ESM: Error estándar de la media

FAL: Fosfatasa alcalina

Fig.: Figura

g: Gramo

GR: Glóbulos rojos

GSSG: Glutación oxidado

GSH: Glutación

GST: Glutación S transferasa

Ha: Hectárea

H/L: Relación heterófilos/linfocitos

HCl: Ácido clorhídrico

HClO: Ácido hipocloroso

HClO₄: Ácido tetraoxoclórico

H₂O: Agua

H₂O₂: Peróxido de hidrogeno

IQ: Isla Quiroga

L: Litro

LDH: Lactato deshidrogenasa

LT: Leucocitos totales

M: Molar

MDA: Malondialdehído

mg: Miligramo

MgSO₄: Sulfato de Magnesio

min: Minutos

ml: Mililitro

mm: Milímetro

mmol: Milimol

n: Número de experimentos, animales o muestras

N: Normal

NaHCO₃: Bicarbonato de sodio

Na₃PO₄: Fosfato trisódico

nmol: Nanomol

nm: nanómetros

NS: No Significativo

OXY: Capacidad total de antioxidantes

O₂: Oxígeno

p/v: Peso/volumen

Prot.: Proteínas

PT: Proteínas totales

R: Reducido

ROOH: Hiperóxidos

ROM: Metabolitos reactivos del oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

seg.: Segundos

SL: San Lorenzo

SOD: Superóxido dismutasa

T: transferasa

TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TNB: Ácido 5-tio-bis-2-nitrobenzoico

UI: Unidades internacionales

vs.: Versus

μl: Microlitro

μM: Micromolar

μmol: Micromol

-SH: Grupos tioles