



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

TESIS DOCTORAL EUROPEA

**La sangre como marcador  
de utilidad clínica y toxicológica: estudio de  
los efectos de los contaminantes persistentes  
en tortugas marinas**

**MARÍA CAMACHO RODRÍGUEZ**

Las Palmas de Gran Canaria, 2013











**D. MIGUEL BATISTA ARTEAGA, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento toma el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación a la tesis doctoral titulada "LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS MARINAS" presentada por la doctoranda D.<sup>a</sup> María A. Camacho Rodríguez y dirigida por los Dres. D. Jorge Orós Montón, D. Octavio Pérez Luzardo y D. Luis Domínguez Boada.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el artº 5 del Reglamento para la Elaboración, Tribunal, Defensa y Evaluación de Tesis Doctorales de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Arucas, a diez de mayo de dos mil trece.





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA



**Facultad de Veterinaria**  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

**PROGRAMA DE DOCTORADO CLÍNICA  
E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA**

**TESIS DOCTORAL  
Doctorado Europeo**

# **LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS MARINAS**

*Memoria que para optar al grado de  
Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,  
presenta la Licenciada*

MARIA CAMACHO RODRÍGUEZ

Directores:

Dr. JORGE ORÓS MONTÓN  
Dr. OCTAVIO PÉREZ LUZARDO  
Dr. LUIS DOMÍNGUEZ BOADA

*Jorge Orós*

*Octavio Pérez*

*Luis Domínguez*

*María Camacho*

**Las Palmas de Gran Canaria, 1 de Julio de 2013**





**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CLÍNICA  
E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA**

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

**TESIS DOCTORAL  
Doctorado Europeo**

**LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA  
Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS  
CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS  
MARINAS**

Doctoranda

MARIA CAMACHO RODRÍGUEZ

*Este trabajo ha sido financiado en parte por una beca de investigación concedida por la Consejería de Educación del Cabildo de Gran Canaria (BOP no 168, 31/12/08) y por el proyecto PI2007/044 de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias.*



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

**JORGE ORÓS MONTÓN**, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA, FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

## **CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado **“LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS MARINAS”**, ha sido realizado por D<sup>a</sup> MARIA CAMACHO RODRÍGUEZ, en el Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a uno de Julio de dos mil trece.

*Fdo: Jorge Orós Montón*





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

**OCTAVIO PÉREZ LUZARDO**, PROFESOR TITULAR DE TOXICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS, FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

## **CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado **“LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS MARINAS”**, ha sido realizado por D<sup>a</sup> MARIA CAMACHO RODRÍGUEZ, en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a a uno de Julio de dos mil trece.

*Fdo: Octavio Pérez Luzardo*





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

**LUIS DOMÍNGUEZ BOADA**, PROFESOR TITULAR DE TOXICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

## **CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado “LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS MARINAS”, ha sido realizado por D<sup>a</sup> MARIA CAMACHO RODRÍGUEZ, en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas, bajo su codirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente Memoria, la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a uno de Julio de dos mil trece.

*Fdo: Luis Domínguez Boada*







DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE  
ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**PAOLA RONCADA**, Professor of Veterinary Toxicology, Department of Veterinary Medical Sciences, School of Agriculture and Veterinary Medicine, *Alma Mater Studiorum*, University of Bologna, Bologna, Italy

**REPORT:**

Dr **Maria Camacho Rodríguez**, degree in Veterinary Medicine, has worked out the dissertation manuscript entitled “**LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS MARINAS**”.

The candidate worked for her thesis under the direction of the following professors: Director **Dr. Jorge Orós Montón**, Professor of Toxicology of the University of Las Palmas de Gran Canaria, and Codirectores **Dr. Octavio Pérez Luzardo**, Professor of Toxicology of the University of Las Palmas de Gran Canaria and **Dr. Luis Domínguez Boada**, Professor of Toxicology of the University of Las Palmas de Gran Canaria.

During her period of study, dr. Camacho Rodríguez has evaluated the levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and heavy metals and essential elements in loggerhead sea turtles.

The candidate seems demonstrate a practical research skills and a good knowledge of the topics relevant to the research topic. Furthermore she has generated several international papers and communications to international congresses.

However I considered her study as eligible and scientific significance to obtain the European Doctorate.

Bologna, June 10, 2013





## **Università Degli Studi di Teramo**

**Facoltà di Bioscienze e tecnologie agro-alimentari e ambientali**

Via Carlo R. Lericci 1

64023 Mosciano Sant'Angelo - Teramo

**Michele Amorena** *Coordinatore Prof. of* Unità di ricerca in Ambiente e Salute  
INFORM:

I read the thesis titled “LA SANGRE COMO MARCADOR DE UTILIDAD CLÍNICA Y TOXICOLÓGICA: ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES PERSISTENTES EN TORTUGAS MARINAS” written by Maria Camacho Rodriguez.

The work is well structured and organized; the introduction section gives a good analysis of present knowledge on main toxicant impacting sea turtle health, both organic and inorganic.

The plan of the study is well done and focuses on well-defined objective, which have been achieved in the results section.

The methodological section presents a good research design and proves a good knowledge of the techniques applied, and the statistics used is correct and allows a good evaluation of results.

The production originated from obtained results lead to two published papers and allows a noticeable improvement of knowledge on contaminant levels in loggerhead turtle and on the potential health effects due to exposure to organic and inorganic contaminants.

Additionally, it gives, due to the total number of samples analysed, a baseline for haematological levels of contaminants in this species, which could be used for future researches on sea turtles.

As a whole, present PhD thesis presents a notable and huge amount of work, which lead to novel and important results in the field of sea turtle toxicology, and is worth for the final discussion in order to get the PhD.

My evaluation is thus absolutely positive.

Teramo 19 maggio 2013

Michele Amorena

Unità di ricerca in Ambiente e Salute  
Coordinatore Prof. **Michele Amorena** DVM, PhD; [mamorena@unite.it](mailto:mamorena@unite.it)  
Via F. Crispi, 212 – 64100 TERAMO  
Tel +39 861 266964 - 861 266988 – fax 861 266987



*A mi madre*





## Agradecimientos

Con el dinero que mi madre me dio para comprarme unas gafas de vista (50.000 pesetas de la época) me apunté al voluntariado del Programa de Conservación de tortuga boba de Boavista (Cabo Verde), en el verano del año 2000. Si en aquel momento alguien me hubiese dicho que varios años después volvería a colaborar y muestrear tortugas nidificantes para investigar, me hubiera costado mucho creerlo. En aquel entonces estaba empezando la carrera de veterinaria y, una cosa es verdad, ni durante los años de estudio universitario, ni cuando acabé, me imaginé realizar una Tesis Doctoral. Sin embargo, años después volví a Boavista para trabajar con estos seres tan increíblemente espectaculares, de lo cual estoy inmensamente agradecida... Y es a estos seres a los que debo agradecer en primera instancia el que esté escribiendo estas líneas. Gracias por haber soportado más de un pinchazo... y deseo que este trabajo contribuya a mejorar la situación tan comprometida por la que están pasando todas las tortugas marinas.

Hoy, después de algunos años y miles de vivencias compartidas, muchas son las personas a las que debo y quiero agradecer su ayuda.

Nadie dijo que este sería un camino fácil. Con todos sus momentos, buenos y malos, altos y bajos, sin duda, volvería a empezar. Haber realizado esta Tesis Doctoral me ha permitido trabajar, compartir y conocer a personas que me han enriquecido tanto profesional como personalmente.

En primer lugar y como no puede ser de otro modo, agradezco a mis tres Directores Jorge, Octavio y Luis. He de reconocer que he tenido una suerte enorme teniéndoles a ellos como guías. Por ser unos Profesionales "como la copa de un pino", pero sobre todo por ser tan buenas personas.

Gracias Jorge por haberme ofrecido esta oportunidad cuando ni si quiera yo me lo planteaba. Por confiar en mí... Por animarme en algunos momentos en que lo he necesitado y por ayudarme SIEMPRE. Desde los "inicios más iniciales" hasta el final, sin ti no hubiese sido posible nada de todo esto. Tu saber estar y tu buena reacción en algunos momentos han sido fundamentales para darme ánimos y fuerzas cuando lo he necesitado. Gracias por tu paciencia, sobre todo al comienzo de esta aventura. Siento un respeto inmenso hacia tu persona. Siempre tendré presente tu gran profesionalidad, tu enorme capacidad, tu sentido de la responsabilidad y tu trato siempre cercano.

A Octavio, más que un Director. Tu infinita paciencia, tu comprensión, tu amabilidad... Gracias por "tu frikismo" en el laboratorio. Por contagiarme tus ganas de averiguar e ir más allá y sobre todo por hacerme creer en todo lo que hacía. Contigo he descubierto la magia de la investigación. Además ambos compartimos ese lado ecologista y más crítico, y nuestra preocupación y sensibilidad por conservar este planeta.

22

Muchas gracias también a ti Luis. Tus sabios consejos (no por viejo... que conste) han sido imprescindibles. Contigo he aprendido muchísimo a mejorar los diferentes trabajos en manuscritos para publicación (que tiene tela!). Gracias también por tu paciencia y tu ayuda. Gracias por tu guía en la estadística y dar respuesta a preguntas que yo sola nunca hubiese podido contestar. Tu humor ha puesto color y alegría en momentos que para mi eran grises. Pero sobre todo, muchas gracias por mostrarme el camino ante un futuro incierto.

A Pascual Calabuig, Veterinario del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira. Sin él nunca hubiese empezado este trabajo. Gracias Pascual por haber pensado en mí y gracias por convencerme de que lo iniciase. Gracias por tu ayuda inicial en la búsqueda de becas. Este trabajo ha sido el nexo perfecto que me ha permitido formarme también en la clínica veterinaria de fauna salvaje durante este tiempo y acercarme al mundo de la conservación. Gracias por enseñarme muchísimas cosas y por confiar siempre en mí.

Gracias a Pino Quintana. Nunca sabré como mostrarte mi agradecimiento a tu desinteresada ayuda con el análisis estadístico de datos. Gracias a ti me inicié en "el oculto mundo" de la estadística. GRACIAS por tu paciencia cuando para mi todo lo que me decías sonaba a chino y por poner luz al final del túnel. Gracias a ti he aprendido muchísimo en algo que nunca me hubiese imaginado y sin duda tu despertaste mi interés en saber más.

Gracias a la Fundación Loro Parque por confiar e impulsar este trabajo de esta Tesis Doctoral.



A todo el personal de Tafira. A Loli por convertirse en una muy buena compañera de trabajo y ayudarme en todo lo que estaba de su mano. A Iballa por facilitarme el trabajo y preocuparse siempre. JUANITO, ¡Paquito!, Toni, Carlos, Santi, Daida, Saulo, Manolo y Vicente me han ayudado con la logística y con las tortuguitas en recuperación. Siempre dispuestos a tenderme una mano cuando lo he necesitado, que han sido muchísimas muchísimas veces. Muchas gracias también a Ale, colega veterinario, compañero becario de Tafira, pero sobre todo amigo. Gracias por ayudarme siempre que te lo he pedido. Tengo que agradecer también a los numerosos voluntarios en prácticas que han pasado por el hospital y me han ayudado, especialmente a Judit Pinós, amiga y la mejor tortuguera del mundo mundial. Gracias Ju!!! Sin ti no sé qué hubiera hecho.

A la ONG Natura 2000 de Cabo Verde. Gracias a Luis Felipe López Jurado por aceptarme en el Campamento de Ervatao durante todos los veranos de muestreo. A María, Saray y Ana por facilitarme todo lo que he necesitado y así poder realizar parte de este trabajo en Boavista. Y por supuesto a las personas de Boavista que hacen que te sientas que estás en un sitio que no quieres abandonar. Tengo que nombrar con especial cariño a Fortu por darme cariño y preocuparse por mí, por su rico pan y cuidarnos con sus súper desayunos. Julião por darnos alegría con sus bailes y su risa, sus viajes en el coche con la música caboverdiana a todo volumen recorriendo un paisaje único estarán siempre en mi recuerdo. También tengo que agradecer a todos los monitores y voluntarios con los que he coincidido en Ervatao y han participado en mi trabajo ayudándome cada noche.

Si me tuviera que quedar con una única persona de mis estancias en Boavista, sin duda ese sería PEDRÍN. El mejor amigo, compañero de trabajo (fiki máximo) y con el que comparto muchísimas cosas. Gracias Pedro por haberme ayudado en tantísimas cosas. Por facilitarme temas logísticos imprescindibles en un lugar como Boavista, por tu gran ayuda en la playa y en el campamento, por escucharme, por tus ánimos y por preocuparte siempre por mí. ¡GRACIAS!

Junto a Pedro debo agradecer a Estra de Naturalia, agencia local de ecoturismo de la isla de Boavista, y a sus trabajadores, quienes me avisaban y colaboraban para que pudiera muestrear también las tortugas que ellos marcaban. A Genaro con el me divertía mucho con sus ocurrencias y simpatía. A Chifo! Al que creo que nunca entendería correctamente ni aun estando toda la vida en Boavista, y menos aún por un walkie talkie!! (yo no sé si había encontrado una tortuga o no, si ésta estaba saliendo del mar, volviendo, poniendo los huevos o que ¡madre mía!). Nunca olvidaré la noche que me gritaba tirando de mi mano y corriendo: Força María! Força María! cuando me iba quedando sin fuerzas en la carrera de una punta a otra de Punta Cosme (con flato incluido). Gracias también a Carol y Tom por la ayuda prestada.

Gracias a mis compis del laboratorio de toxicología. A Maira que me enseñó y explicó las técnicas de extracción y analíticas a mi llegada al laboratorio. Gracias por atender todas mis dudas y ayudarme siempre que te lo he pedido y cuando no te lo he pedido (también). A Mayeya, por ayudarme con el trabajo de laboratorio y por su alegría. A Marta, compañera inseparable de escritura, gracias por tu siempre buen humor. Gracias también a Natalia, Ángel y Norberto. A todos ellos por ser unos EXCELENTES compañeros y amigos. Por su continua compañía, sus ánimos y por ayudarme siempre que he necesitado de su ayuda. Muchas gracias a Manuel Zumbado, siempre disponible para cualquier cosa que necesitase. Y a Luisillo y su niño lindo! Por hacerme compañía algunas tardes en el despacho.

Mi sincero agradecimiento a Lisa por haberme aceptado en su laboratorio en Italia y por facilitármelo todo. Muchas gracias a Marina quien me ayudó con el análisis de las muestras en Cesenático, sin ti no sé qué hubiese hecho. Gracias también a Constanza y a todos los que formaban parte del laboratorio y que de una manera u otra conocí durante mi estancia en Italia y me hicieron sentir como en casa.

24

Millones de gracias a TT por su ayuda en el diseño. Por hacerlo todo muy fácil, por su gusto y por darme la motivación que me faltaba cuando ya estaba hasta "el moño de todo". GRACIAS!

A mis compañeros de veterinaria aspirante también a Doctores, algunos de ellos ya lo han conseguido. A mi amiga Elena Carretón, con la que he compartido muchos momentos, siempre dispuesta a escucharme y ayudarme. Gracias Helen! Y a otros muchos como Beatriz Domínguez, Noé, Esteban, Alejandro Suárez Bonet... A todos ellos porque recorrer este camino siempre es más fácil si puedes sentirte entendido por personas que lo comparten.

Al personal y a los trabajadores de la Facultad de Veterinaria. Especialmente a Gloria por su siempre sonrisa. A Antonio, el mejor administrativo que pueda existir, por hacer los papeleos siempre más fáciles. A Mari Carmen por su paciencia y ayuda en muchísimas ocasiones. Y a Guillermo, por omitir fechas que me iban en contra. Gracias también a Ricardo por las facilidades aportadas en los últimos trámites.

Muchas gracias a Cande por su apoyo en el laboratorio de Patología Animal. Y gracias también a Irene por su ayuda en los primeros años de este trabajo.

A Julio León, gran amigo y para quien nunca tendré palabras suficientes de agradecimiento. Me has ayudado en tantísimas cosas y en tantísimos momentos... Gracias a ti, momentos difíciles fueron mejor llevados. Tu constante ayuda a horas indecentes, fines de semana y festivos con las tortuguitas que ingresaban en Tafira... no se que hubiera hecho sin tu indispensable colaboración para tomar muestras y medicar (posiblemente contratar a un carpintero para que me diseñase algún artilugio para un manejo más fácil de algunas tortugas, no queda otra!). Por darme esa tranquilidad tan necesaria y hacer que todo fuera tan fácil.

¡MUCHAS GRACIAS JULI! Gracias también a toda la familia León por ser una familia tan bonita y haberme acogido como una más durante mucho tiempo. Y gracias también a FRIDA!!!

Y como no... a mis amigos. A aquellos que han vivido el día a día en esta etapa de mi vida. A Giada (más que una amiga) quien siempre está. A mi gran amiga María Camejo quien me ha dado esos momentos de paz tan necesarios. A mis grandes amigos Pepe y Sara, con quienes he compartido momentos faunísticos inolvidables y son una continua fuente de motivación. Como no a Letizia Fiorucci!, quien también me ayudó mucho en su paso por Tafira y a la que desearía tener más cerca. A Matteo Bucchia por ser tan bueno y haberme ayudado siempre que lo he necesitado. A mis queridas amigas Miriam y Ana siempre disponibles tanto en lo bueno como en lo malo. Y al resto del equipo de AVAFES: Fátima, Judith, Ayose, Ale, Javi, Adrián, Pedro, Rafa, Oliver... por darme tantos momentos de distracción, preocuparse por mí y animarme cuando lo he necesitado. ¡Cuántas risas nos hemos echado! Un grupo maravilloso del que me siento muy orgullosa de formar parte. A mis amigos los ecologistas! Nere, Luis, Brenda, Fredy, Mario y Alberto. A los majoreros! Los amigos de toda la vida, los que siempre están y siempre estarán: GRACIAS Sara, Silvia, María Hernández, Janey, Alfredo, Esther, Yoli, Enrique, María Salvadora, Pedro, Guaxara... por escucharme y preocuparse por mí. Alguna apuesta he perdido en el camino, no sé si me será perdonada... Gracias también a Inés, Carmen y Patricia Álvarez por formar parte de mi gente querida. Y al resto de amigos que aun estando más lejos, han seguido estos años de mi vida también de cerca, especialmente a Bea y Rayco.

A MI FAMILIA. Gracias Cris, mi hermanita del alma, por quererme tal y como soy. A mi padre! Genio y figura, por enseñarme a querer a los animales y respetar la naturaleza. A mis tíos Bienve y Juan Fernando por sus consejos y ánimos. A mis primitas favoritas, Carla e Yle. Y gracias también al resto de la familia, especialmente a mis tíos María Jesús, Juanbe, Delmi y Oscar por preocuparse siempre por mí.

A Fede. Quien me acompaña cada día. Por quererme, tanto con mis virtudes como con mis defectos. Muchas gracias por tus ánimos cuando tanta falta me hacen. Gracias por aguantarme en momentos difíciles. Y MUCHAS GRACIAS por haberme ofrecido una experiencia inolvidable en la India. El regalo más grande que nunca he recibido que me permitió conocer a personas fantásticas en un mundo diferente y genial. Gente maravillosa como la de Elsewhere que me dieron la oportunidad de descubrir tortugas oliváceas en un sitio mágico, Thanks Denzil!

Por último, me gustaría agradecer a mi mamá. Porque madre solo hay una, y de verdad. Nadie se preocupa como ella, nadie desea más que ella lo mejor para mí, nadie se alegra como ella cuando las cosas van bien y nadie me quiere como ella. Por ayudarme, apoyarme y animarme siempre. GRACIAS MAMÁ, a ti te dedico este trabajo.



# Índice

<b>Resumen</b> .....	33
----------------------	----

<b>Estructura del presente manuscrito de Tesis Doctoral</b> .....	35
---	----

## INTRODUCCIÓN

<b>1. Generalidades de las tortugas marinas</b> .....	41
1.1. Origen de las tortugas marinas actuales .....	41
1.2. La tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> Linneo, 1758).....	42
1.3. Reproducción y ciclo de vida .....	43
1.4. Amenazas de las tortugas marinas .....	44
<b>2. Valores hematológicos y bioquímicos de las tortugas marinas</b> .....	49
<b>3. La contaminación química global</b> .....	52
<b>4. Características generales de los contaminantes tóxicos persistentes (CTPs)</b> ..56	
4.1. Contaminantes orgánicos persistentes (COPs) .....	59
4.1.1. Plaguicidas organoclorados.. .. .	62
4.1.1.1. Clasificación y propiedades físico-químicas .....	63
4.1.1.2. Parámetros toxicocinéticos .....	65
4.1.1.3. Mecanismo de acción y toxicidad .....	66
4.1.2. Dioxinas y compuestos análogos a las dioxinas .....	68
4.1.2.1. Clasificación y propiedades físico-químicas .....	69
4.1.2.2. Parámetros toxicocinéticos .....	69
4.1.2.3. Mecanismo de acción y toxicidad .....	70

4.1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	72
4.1.3.1. Clasificación y propiedades físico-químicas .....	73
4.1.3.2. Parámetros toxicocinéticos .....	74
4.1.3.3. Mecanismo de acción y toxicidad .....	75
4.2. Contaminantes inorgánicos persistentes (CIPs) .....	76
4.2.1. Toxicocinética, mecanismo de acción y toxicidad de los CIPs .....	78
4.3. Los contaminantes químicos como disruptores endocrinos .....	79
<b>5. Contaminantes tóxicos persistentes en fauna salvaje .....</b>	<b>82</b>
5.1. Breve descripción general .....	82
5.2. CTPs en animales de vida acuática .....	83
5.3. Factores biológicos que afectan la persistencia de los niveles de contaminantes en el organismo .....	86
5.3.1. Composición corporal y condición nutritiva .....	86
5.3.2. Dieta .....	87
5.3.3. Edad .....	90
5.3.4. Sexo .....	92
5.3.5. Migración o incidencia a enfermedades .....	94
5.4. Efectos de los contaminantes sobre poblaciones de fauna salvaje .....	96
5.4.1. Efectos de los CTPs sobre la supervivencia .....	96
5.4.2. Efectos de los CTPs sobre la reproducción .....	104
5.4.3. Efectos de los CTPs sobre el crecimiento .....	108
 <b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	 <b>111</b>
 <b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	 <b>117</b>
<b>1. Área de estudio y muestreo .....</b>	<b>119</b>
1.1. Archipiélago de Canarias .....	120
1.1.1. Toma de datos y muestreo .....	120
1.2. Archipiélago de Cabo Verde .....	122
1.2.1. Toma de datos y muestreo .....	123
1.3. Almacenamiento y tratamiento de muestras previo a los análisis clínicos y toxicológicos .....	124
<b>2. Análisis clínicos .....</b>	<b>125</b>
2.1. Análisis hematológicos .....	125
2.1.1. Recuento total de eritrocitos .....	125
2.1.2. Recuento total de leucocitos .....	126
2.1.3. Recuento diferencial leucocitario .....	126
2.1.4. Estimación del número de trombocitos .....	127
2.2. Análisis bioquímicos .....	127

<b>3. Análisis toxicológicos</b> .....	128
3.1. Generalidades .....	128
3.2. Material, reactivos e instrumental .....	129
3.2.1. Reactivos .....	129
3.2.2. Material .....	132
3.2.3. Aparatos auxiliares .....	133
3.2.4. Instrumentación analítica y accesorios .....	134
3.3. Procedimientos .....	135
3.3.1. Preparación de patrones y materiales de referencia .....	135
3.3.1.1. Preparación de soluciones de fortificación de los COPs .....	135
3.3.1.2. Fortificación con COPs de muestras de plasma .....	135
3.3.1.3. Preparación de rectas de calibrado de COPs .....	136
3.3.1.4. Preparación de rectas de calibrado de CIPs .....	137
3.3.2. Preparación de las muestras .....	137
3.3.2.1. Preparación de las muestras de plasma para el análisis de COPs .....	137
3.3.2.2. Extracción .....	138
3.3.2.2. Preparación de muestras de sangre para el análisis de CIPs ..	138
3.3.3. Análisis químico .....	138
3.3.3.1. Análisis de COPs .....	138
3.3.3.2. Análisis de CIPs .....	145
<b>4. Análisis estadístico de los datos</b> .....	147

## CAPÍTULO I

### **Metabolic and respiratory status of stranded juvenile loggerhead sea turtles**

<b>(<i>Caretta caretta</i>): 66 cases (2008–2009)</b> .....	149
ABSTRACT .....	151
INTRODUCTION .....	151
MATERIAL AND METHODS .....	151
RESULTS .....	152
DISCUSSION .....	154
CONCLUSIONS .....	155

## CAPÍTULO II

### **Salt gland adenitis as only cause of stranding of loggerhead sea turtles *Caretta***

<b><i>caretta</i></b> .....	157
ABSTRACT .....	159
INTRODUCTION .....	159
MATERIAL AND METHODS .....	159
RESULTS .....	160
DISCUSSION .....	161

### **CAPÍTULO III**

#### **Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyls in plasma of juvenile and adult nesting *Caretta caretta* from the Eastern Atlantic** .....

ABSTRACT .....	163
INTRODUCTION .....	166
MATERIAL AND METHODS (Animal data) .....	167
RESULTS .....	168
DISCUSSION .....	173
CONCLUSIONS .....	178

### **CAPÍTULO IV**

#### **Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles**

<b>(<i>Caretta caretta</i>)</b> .....	179
ABSTRACT .....	181
INTRODUCTION .....	182
MATERIAL AND METHODS (Animal data) .....	183
RESULTS .....	185
DISCUSSION .....	187
CONCLUSIONS .....	189

### **CAPÍTULO V**

#### **Heavy metals and essential elements values in blood of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from a nesting colony of Boavista Island**

<b>(Cape Verde, West Africa)..</b> .....	193
ABSTRACT .....	195
INTRODUCTION .....	196
MATERIAL AND METHODS (Animal data) .....	197
RESULTS .....	197
DISCUSSION .....	202
CONCLUSIONS .....	207

### **CAPÍTULO VI**

#### **Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles**

<b>(<i>Caretta caretta</i>)</b> .....	209
ABSTRACT .....	211
INTRODUCTION .....	212
MATERIAL AND METHODS (Animal data) .....	213
RESULTS .....	214
DISCUSSION .....	219
CONCLUSIONS .....	223



## **CAPÍTULO VII**

### **Monitoring organic pollutants and metals in juvenile loggerhead sea turtles**

<b>(<i>Caretta caretta</i>) undergoing rehabilitation</b> .....	225
ABSTRACT .....	227
INTRODUCTION .....	228
MATERIAL AND METHODS (Animal data) .....	229
RESULTS .....	229
DISCUSSION .....	232
CONCLUSIONS .....	239

<b>CONCLUSIONES</b> .....	241
---------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	245
---------------------------	-----

1. Referencias bibliográficas .....	247
2. Referencias electrónicas .....	275

<b>GLOSARIO</b> .....	277
-----------------------	-----

## **ANEXO I**

### **Crude oil as stranding cause among loggerhead sea turtles**

<b>(<i>Caretta caretta</i>) in the Canary Islands, Spain (1998-2011)</b> .....	283
--	-----

## **ANEXO II**

### **Pansteatitis associated with high levels of polychlorinated**

<b>biphenyls in a wild loggerhead sea turtle <i>Caretta caretta</i></b> .....	289
---	-----



## Resumen

Durante el transcurso del siglo XX se produjeron innumerables cambios en el ritmo de crecimiento y producción de la civilización humana. El desarrollo de la agricultura intensiva, la concentración a gran escala de las zonas urbanas y la creciente industrialización, han contribuido a la contaminación global de los ecosistemas marinos. Las principales sustancias introducidas por la actividad del hombre incluyen compuestos organoclorados, productos derivados del petróleo y metales pesados. Muchos de estos compuestos son liberados y depositados de forma permanente y es por esto que comúnmente son reconocidos dentro del grupo de Contaminantes Tóxicos Persistentes (CTPs).

Los CTPs se caracterizan por su escasa degradación, capacidad para bioacumularse y por sus conocidos efectos carcinogénicos y como disruptores endocrinos y metabólicos. De hecho, a pesar de que el uso y fabricación de algunas de estas sustancias fue prohibido en los años 1970-80, todavía hoy se siguen detectando en muestras humanas, animales o medioambientales.

Debido a su toxicidad y persistencia medioambiental, resultan importantes los estudios de detección de niveles de CTPs en las poblaciones de animales de vida libre. Y ello es especialmente relevante para aquellas especies, que como las tortugas marinas, se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, pues los efectos que estas sustancias ocasionan en el organismo podrían contribuir al decline de tales poblaciones. En este contexto hemos de reseñar que los CTPs han sido detectados en tejidos de tortugas marinas de todo el mundo y que la contaminación química se postula como un gran factor de riesgo para la conservación de las diferentes especies de tortugas marinas.

El presente trabajo estudia los perfiles de contaminación por CTPs en sangre de las poblaciones de tortuga boba de Canarias y Cabo Verde. Además analiza los potenciales efectos tóxicos de los contaminantes sobre el estado general de las tortugas y sus parámetros clínicos, observándose numerosas asociaciones entre las concentraciones de CTPs y el estado de salud las tortugas.

## Estructura del presente manuscrito de tesis doctoral

Hemos creído conveniente para una mejor comprensión del presente manuscrito incluir este apartado en el que explicamos cuál ha sido la estructura que hemos elegido para presentar los resultados y conclusiones obtenidas.

Dado que el trabajo realizado durante estos años ha dado lugar a la preparación de varios manuscritos para publicación en revistas científicas internacionales hemos decidido presentar los resultados de esta Tesis Doctoral manteniendo la estructura de dichas publicaciones, en el idioma original en el que fueron escritas (inglés), ya que esta Tesis Doctoral opta a la titulación homologada de la UE. No obstante, para facilitar su lectura y contextualización hemos preparado un capítulo de introducción general. Aunque cada capítulo-manuscrito tiene su pequeña introducción individual.

Seguidamente a la introducción general se exponen la Justificación y Objetivos principales del presente trabajo de Tesis Doctoral.

Con respecto a la descripción del Material y Métodos y la relación de referencias bibliográficas se ha optado por unificar la información y presentarlas de forma conjunta, salvo para los Capítulos I y II, donde se ha insertado la separata original del artículo publicado para el correspondiente estudio debido a que estos dos últimos capítulos-manuscritos presentan una metodología diferente. En el resto de Capítulos (III-VII), se exponen los resultados, discusión y conclusiones correspondientes a cada estudio, además de su breve introducción, como ya comentamos anteriormente.

Las conclusiones generales se presentan igualmente de forma conjunta para todos los capítulos al final del presente manuscrito.

De esta manera este manuscrito de Tesis Doctoral consta de siete capítulos diferentes, correspondiendo cada uno de ellos con un trabajo preparado para publicación internacional. Los capítulos que conforman esta Tesis Doctoral son los siguientes:

**CAPÍTULO 1: Estado metabólico y respiratorio de tortugas boba (*Caretta caretta*) juveniles varadas: 66 casos (2008–2009).** En este apartado se evalúan los desórdenes ácido-base y bioquímicos que las tortugas presentan en el momento del ingreso al hospital, determinando de esta manera el tipo de deshidratación desarrollado. Además se estudiaron diferencias entre las causas de ingreso y la evolución de las tortugas y se establecen rangos de referencia de valores de rehabilitación de pH, gases sanguíneos, electrolitos, glucosa, BUN y osmolalidad. *Publicado en Journal of the American Veterinary Medical Association, 2013 Vol 242 (3): 396-401.*

**CAPÍTULO 2: Adenitis de la glándula de sal como única causa de varamiento en tortugas boba (*Caretta caretta*) varadas.** En este trabajo se describe la morfología y patología de la adenitis de la glándula de sal como una causa de varamiento en tortugas boba. Además se evalúan la concentración en plasma de sodio, cloro y osmolalidad en dos de las tortugas que ingresaron vivas y presentaron la misma lesión en la glándula sal, evolucionando negativamente. *Publicado en Diseases of Aquatic Organisms, 2012 Vol 95: 163–166.*

**CAPÍTULO 3: Determinación de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en plasma de juveniles y hembras nidificantes de *Caretta caretta* del Este del Atlántico.** En este capítulo se determinan concentraciones en plasma de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y se evalúan las diferencias entre grupos de tortugas, zonas geográficas, años de muestreo y tamaño de las tortugas. Además en el caso de las tortugas juveniles, se evalúan las posibles asociaciones entre las causas de varamiento de los animales y la concentración de COPs. *Aceptado para publicación en la revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.*

**CAPÍTULO 4: Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en plasma de juveniles y hembras nidificantes de *Caretta caretta* del Este del Atlántico.** En este apartado se determinan las concentraciones en plasma de PAHs y se estudian las diferencias entre grupos de tortugas, zonas geográficas, años de muestreo y tamaño de las tortugas. También, en el caso del grupo de tortugas juveniles, se evalúan las posibles asociaciones entre las causas de varamiento de los animales y la concentración de PAHs. *Publicado en Marine Pollution Bulletin, 2012 Vol 64:1974–1980.*

**CAPÍTULO 5: Determinación de metales y metaloides en sangre de *Caretta caretta* de la población nidificante en Boavista (Cabo Verde).** En este capítulo se monitorizan los niveles de contaminantes inorgánicos persistentes (CIPs) en sangre de tortuga boba de hembras nidificantes sanas. Además se estudian los potenciales efectos de los CIPs sobre parámetros generales de salud y el tamaño de hembras adultas. Igualmente se analizan diferencias con el tamaño de las tortugas y los niveles de contaminación. *Aceptado para publicación en la revista Marine Environmental Research.*

**CAPÍTULO 6: Posibles efectos adversos sobre la salud de los contaminantes orgánicos persistentes en tortugas marinas: evidencias de un estudio transversal en tortugas bobas (*Caretta caretta*) de Cabo Verde.** En este capítulo se estudian los potenciales efectos de los COPs sobre parámetros hematológicos y bioquímicos de tortugas sanas nidificantes. Además se evalúan diferencias observadas entre el tamaño de las tortugas y las concentraciones de contaminantes encontradas. *Publicado en Science of the Total Environment, 2013 Vol 458-460: 283–289.*

**CAPÍTULO 7: Determinación de COPs y metales en juveniles de tortugas boba (*Caretta caretta*) durante el periodo de rehabilitación.** En el presente capítulo, además de monitorizar los niveles de CTPs durante diferentes momentos del proceso de recuperación de las tortugas, se evalúan los potenciales efectos de los CTPs sobre parámetros sanguíneos. Además, se estudian diferencias de contaminación entre tortugas que mueren durante el periodo de rehabilitación con aquellas que sobreviven. Igualmente se analizan las posibles diferencias con las variadas causas de varamiento y la condición corporal de las tortugas en el momento del ingreso con la concentración de contaminantes. *En el momento del depósito de esta Tesis Doctoral el presente capítulo-manuscrito se encuentra en fase de revisión para su publicación internacional.*

Además, se anexan dos trabajos llevados a cabo durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral por parte de nuestro grupo de investigación y que guardan relación con el contenido de este manuscrito:

**ANEXO I:** Crude oil as stranding cause among loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Canary Islands, Spain (1998-2011).

**ANEXO II:** Pansteatitis associated with high levels of polychlorinated biphenyls in a wild loggerhead sea turtle *Caretta caretta*.





# INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de las tortugas marinas
2. Valores hematológicos y bioquímicos de las tortugas marinas
3. La contaminación química global
4. Características generales de los contaminantes tóxicos persistentes (CTPs)
5. Contaminantes tóxicos persistentes en fauna salvaje



## INTRODUCCIÓN

<b>1. Generalidades de las tortugas marinas</b> .....	41
1.1. Origen de las tortugas marinas actuales .....	41
1.2. La tortuga boba ( <i>Caretta caretta</i> Linneo, 1758).....	42
1.3. Reproducción y ciclo de vida.....	43
1.4. Amenazas de las tortugas marinas .....	44
<b>2. Valores hematológicos y bioquímicos de las tortugas marinas</b> .....	49
<b>3. La contaminación química global</b> .....	52
<b>4. Características generales de los contaminantes tóxicos persistentes (CTPs)</b> 56	
4.1. Contaminantes orgánicos persistentes (COPs) .....	59
4.1.1. Plaguicidas organoclorados .....	62
4.1.1.1. Clasificación y propiedades físico-químicas .....	63
4.1.1.2. Parámetros toxicocinéticos.....	65
4.1.1.3. Mecanismo de acción y toxicidad .....	66
4.1.2. Dioxinas y compuestos análogos a las dioxinas .....	68
4.1.2.1. Clasificación y propiedades físico-químicas .....	69
4.1.2.2. Parámetros toxicocinéticos.....	69
4.1.2.3. Mecanismo de acción y toxicidad .....	70
4.1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	72
4.1.3.1. Clasificación y propiedades físico-químicas .....	73
4.1.3.2. Parámetros toxicocinéticos.....	74
4.1.3.3. Mecanismo de acción y toxicidad .....	75
4.2. Contaminantes inorgánicos persistentes (CIPs) .....	76
4.2.1. Toxicocinética, mecanismo de acción y toxicidad de los CIPs.....	78
4.3. Los contaminantes químicos como disruptores endocrinos .....	79
<b>5. Contaminantes tóxicos persistentes en fauna salvaje</b> .....	82
5.1. Breve descripción general .....	82
5.2. CTPs en animales de vida acuática .....	83
5.3. Factores biológicos que afectan la persistencia de los niveles de contaminantes en el organismo.....	86
5.3.1. Composición corporal y condición nutritiva .....	86
5.3.2. Dieta .....	87
5.3.3. Edad .....	90
5.3.4. Sexo .....	92
5.3.5. Migración o incidencia a enfermedades.....	94
5.4. Efectos de los contaminantes sobre poblaciones de fauna salvaje.....	96
5.4.1. Efectos de los CTPs sobre la supervivencia .....	96
5.4.2. Efectos de los CTPs sobre la reproducción .....	104
5.4.3. Efectos de los CTPs sobre el crecimiento.....	108

# 1. Generalidades de las tortugas marinas

## 1.1. Origen de las tortugas marinas actuales

Las tortugas marinas aparecieron en la Tierra en el periodo Cretácico hace aproximadamente unos 110 millones de años, siendo uno de los grupos de seres vivos más primitivos que existen en la actualidad. A mediados del Cretácico, cuatro familias coexistían en los océanos (Spotila, 2004). Tras la gran extinción de los grandes dinosaurios (hace 65 millones de años), dos de estas cuatro familias, *Toxochelyidae* y *Protosteguidae*, desaparecieron. Las tortugas marinas continuaron su desarrollo y expansión, llegando a contabilizarse poblaciones de varios millones de ejemplares durante los siglos XVIII y XIX.

Las otras dos familias, *Dermochelyidae* y *Cheloniidae*, tienen descendientes actuales (Perrine, 2003), siendo siete especies de tortugas marinas los únicos elementos modernos. La tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) es el único miembro superviviente de la familia *Dermochelyidae*. Es la más grande de las especies que existen hoy día. Las otras seis especies pertenecen a la familia *Cheloniidae* y son: la tortuga verde la tortuga plana (*Natator depressus*), la tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), la tortuga boba (*Caretta caretta*), la tortuga golfina (*Lepidochelys kempii*) y la tortuga olivácea (*Lepidochelys olivacea*).

Actualmente, el orden Chelonia, al que pertenecen estos animales, es sin duda uno de los grupos animales más logrados, hasta el hecho de conservar casi sin modificaciones la singular y característica arquitectura corporal que los define desde hace millones de años. El caparazón resulta sin duda, la base fundamental del éxito evolutivo de este diferente e interesante grupo entre los vertebrados (Ferri, 1999).

## 1.2. La tortuga boba (*Caretta caretta* Linneo, 1758)

Las tortugas bobas de hoy día parecen proceder de un stock ancestral común que existió hace aproximadamente unos 3 millones de años, y que quedó separado en dos poblaciones cuando se formó el istmo de Panamá, en el Plioceno: la del Atlántico y la del Indo-Pacífico. Esta antigua separación fue posteriormente modificada por nuevas colonizaciones entre las cuencas del océano Índico y la Atlántico-Mediterránea. Recientes revisiones indican que las poblaciones con mayor número de hembras nidificantes por año (más de 10,000) son las poblaciones de Omán (Masirah Island) y la de la Península de Florida, EE.UU. (Baldwin et al., 2003; Ehrhart et al., 2003; Kamezaki et al., 2003; Limpus and Limpus, 2003; Margaritoulis et al., 2003).

Aunque morfológicamente todas las metapoblaciones de tortuga boba son muy similares, se detectan diferencias genéticas leves pero consistentes comparando tortugas de diferentes zonas geográficas (Bowen et al., 1994). Esta variabilidad genética indica aislamiento reproductor y muy reducido flujo genético entre poblaciones. La principal diferencia se encuentra entre tortugas atlánticas e indo-pacíficas. Dentro de la cuenca atlántica, también se han detectado diferencias significativas entre ambos hemisferios, así como entre el Atlántico Norte y el Mediterráneo oriental (Bowen et al., 1993; Carreras et al., 2007; Encalada et al., 1998; Laurent et al., 1998) aunque se da un reducido nivel de flujo genético entre ambas zonas. Recientemente, se han encontrado diferencias menores pero relevantes entre poblaciones de Brasil, Caribe, Estados Unidos y Cabo Verde (Bowen et al., 2005; Monzón Argüello et al., 2010). La principal razón para explicar esta variabilidad genética sería la gran fidelidad natal de las madres a anidar donde nacieron, fenómeno que les lleva a aparearse en la proximidad de las playas de nidificación.

Comparada con otras especies, la tortuga boba es la tortuga de más amplia distribución (Bolten, 2003b), siendo la única especie que anida exitosamente fuera de los trópicos. Viven y se alimentan en océano abierto y en zonas costeras de todas las cuencas oceánicas tropicales y templadas (Perrine, 2003; Spotila, 2004). La principal característica distintiva de su morfología es el gran tamaño relativo de la cabeza, con su correspondiente musculatura y un gran pico que le permite alimentarse principalmente de crustáceos y moluscos (Dood, 1988; Kamezaki et al., 2003). Su dieta es una de las menos especializadas entre todas las especies. En las etapas del ciclo de vida en las que se alimenta de forma pelágica, pueden ingerir organismos como medusas, ascidias, insectos, huevos y cirrípedos presentes en objetos flotantes, además de peces muertos y casi cualquier cosa que flote incluida la basura (Bjorndal, 1997; Dood, 1988).

### 1.3. Reproducción y ciclo de vida

Las tortugas marinas tienen ciclos de vida complejos que abarcan ecosistemas diversos, desde hábitats terrestres donde tiene lugar la nidificación y la incubación de los huevos, hasta hábitats de desarrollo y alimentación en océano abierto (zona oceánica) y en aguas costeras (zona nerítica) (Bolten, 2003c), exceptuando la tortuga plana que no abandona la zona nerítica (Bolten, 2003c; Bowen and Karl, 2007).

El ciclo de vida de la tortuga boba comienza en la playa de nidificación, donde la hembra sale del mar para depositar los huevos en nidos excavados en la arena. La incubación de los huevos, se realiza en torno a los 50 días sin cuidado parental. Tras el desarrollo embrionario (aproximadamente 2 meses), los neonatos que emergen a la superficie llegan hasta la orilla y se adentran en el mar. Las crías nadarán durante 36 horas seguidas para llegar a alta mar (frenesí natatorio), iniciando así su vida marina. Durante esta fase, los individuos dependen de los nutrientes que les aportan los restos del vitelo. Ésta termina cuando las tortugas comienzan a alimentarse, a menudo mientras permanecen en la zona nerítica (Bolten, 2003a). Su duración es variable, y los movimientos y patrones de distribución de estas pequeñas tortugas dependen de factores oceanográficos y meteorológicos (Bolten, 2003c). Pasarán los primeros años de su vida en zonas oceánicas asociadas a masas de sargazos, algas u otros objetos flotantes (Schwartz, 1988). Para muchas poblaciones se desconoce dónde pasan la primera etapa de su vida después de entrar en el mar, los denominados "años perdidos" (Carr, 1986, 1987). Cuando pasan a la zona oceánica comienza el estadio juvenil. Durante esta etapa de duración prolongada, estimada entre 6,5 y 11,5 años para las poblaciones de *Caretta caretta* del oeste del Atlántico (Bjorndal et al., 2000b), las tortugas se mueven pasiva y activamente, dependiendo de la capacidad natatoria, relacionada con el tamaño de los individuos y la velocidad de las corrientes (Monzón-Argüello et al., 2009; Revelles et al., 2007). En esta etapa juvenil oceánica, las tortugas son epipelágicas, aunque pueden acercarse a islas oceánicas y montañas submarinas, donde pueden alimentarse de organismos bentónicos. En las proximidades de las islas oceánicas (por ejemplo: Azores, Madeira y Canarias), coinciden individuos de diferentes poblaciones de origen (Bolten et al., 1998; Monzón-Argüello et al., 2009), constituyendo lo que se denomina una zona de mezcla o mixed stock (Bolten, 2003a).

Posteriormente las tortugas dejan la zona oceánica y realizan una migración de retorno mediante la que se aproximan a lugares más cercanos a su zona de nacimiento, donde se produce un cambio en la alimentación, pasando a una fase juvenil nerítica (Musick and Limpus, 1997). En esta fase, las tortugas son activas y se alimentan principalmente en el fondo, aunque también capturan presas en la columna de agua. Posteriormente, pasan a convertirse en adultos neríticos que pueden compartir el mismo hábitat de alimentación con los juveniles o pueden pasar a otros lugares. Estudios recientes han encontrado tortugas adultas de las

poblaciones de Japón (Hatase et al., 2002), Cabo Verde (Hawkes et al., 2006) y de la costa este de Florida (EE.UU.) (Reich et al., 2010) alimentándose en hábitats oceánicos, por lo que en estos individuos el cambio de pelágico a nerítico podría no producirse o tener lugar más tarde, durante la fase adulta. La maduración sexual en tortugas marinas es tardía, siendo de un promedio de 15 años para *Caretta caretta*.

Al llegar el momento de la reproducción, los machos y las hembras adultos migran de las áreas de alimentación a las áreas de cópula y reproducción. El apareamiento tiene lugar en el mar, aunque también pueden efectuarse durante la migración de un área a la otra. Los machos desarrollan su vida completamente en el mar. Una vez realizadas las cópulas, las hembras seguirán en las áreas de reproducción para realizar las puestas, mientras que los machos volverán a las áreas de alimentación. Durante los tres o cuatro meses que dura la época de nidificación, las hembras se dirigirán a tierra aproximadamente cada 15 días para poner varios nidos (de 2 a 7 nidos), cada uno de ellos con un número de huevos relativamente alto. Después regresarán a las áreas de alimentación hasta el siguiente periodo de reproducción (aproximadamente cada dos años, variando esta frecuencia entre 1 y 4 años). Después de poner el último nido de la temporada, las hembras vuelven a las zonas de alimentación. Las hembras necesitan varios años para recuperarse y volver a anidar (Hamann et al., 2003; Miller et al., 2003). Algunos machos, al menos de ciertas poblaciones, pueden reproducirse anualmente (Hamann et al., 2003; Hays et al., 2010; Wibbles et al., 1990).

## 1.4. Amenazas de las tortugas marinas

Las tortugas marinas actuales son sin duda un ejemplo de evolución y supervivencia, habiendo sobrevivido a varias glaciaciones y la extinción que acabó con los grandes dinosaurios. Sin embargo, a pesar de ser animales bien adaptados a las condiciones del planeta, en la actualidad todas las poblaciones de tortugas marinas se encuentran en un preocupante declive. Según la Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2012), de las siete especies de tortugas marinas que existen, tres se encuentran en peligro crítico de extinción (tortuga laúd - *Dermochelys coriacea*, tortuga carey - *Eretmochelys imbricata*, y tortuga golfina - *Lepidochelys kempii*), dos en peligro de extinción (tortuga boba - *Caretta caretta*, y tortuga verde - *Chelonia mydas*), una en estado vulnerable (tortuga olivácea - *Lepidochelys olivacea*), y de una especie no se poseen datos suficientes para definir su estatus de conservación (tortuga plana - *Natator depressus*). Estudios recientes revelan que por ejemplo, en Florida, donde nidifica la mayor población de tortuga boba del Atlántico, el número de hembras nidificantes se ha visto reducido al 50% en los últimos 5 años (IUCN 2007). La tortuga laúd en el Pacífico, se considera la población de tortugas marinas más amenazada del mundo y su conservación se consideró altamente prioritaria en el año 2010, declarado Año Internacional de la Biodiversidad, precisamente por la alta preocupación de pérdida de diversidad biológica en el planeta.

En los últimos 50 años, los efectos directos e indirectos del creciente desarrollo humano sobre el medio ambiente, han desencadenado una situación severamente comprometida para estos singulares supervivientes. La pesca no selectiva indiscriminada, el desarrollo costero y la contaminación marina son la principal amenaza mundial a la que se encuentran expuestas las tortugas marinas. Esta situación actual ha despertado un creciente interés por la conservación de las tortugas marinas, y numerosos esfuerzos han sido encaminados a un mayor conocimiento y protección de estos maravillosos reptiles.

A pesar que en la actualidad existen numerosas leyes tanto nacionales como internacionales que protegen a estas especies, desgraciadamente todavía hoy el consumo de carne de tortuga marina, el saqueo de huevos en sus puestas, el uso de otros productos de la tortuga como remedios caseros (grasa, sangre, pene, etc.), o la fabricación de artesanías a partir de la concha del caparazón (Marco et al., 2012; Thorbjarnarson et al., 2000) siguen siendo prácticas habituales en diversas regiones del mundo (ej.: Cabo Verde, países de Centroamérica, India, etc.). Aunque históricamente numerosos grupos indígenas han dependido esencialmente de las tortugas marinas como fuente de proteínas para su dieta alimenticia (Chaverri, 2001), el equilibrio entre el hombre y las poblaciones de tortugas marinas se mantuvo con pocos cambios. Sin embargo, en la conocida época de los descubrimientos a partir del siglo XV, los navíos europeos inician la búsqueda de nuevas rutas comerciales. Durante estos viajes, donde se descubrieron y colonizaron nuevos territorios, las tortugas marinas eran muy apreciadas ya que suponían una fuente de alimento fresco con la capacidad además, de permanecer durante mucho tiempo vivas fuera del agua (Spotila, 2004). Las grandes expansiones demográficas de los últimos siglos originaron el declive de muchas poblaciones de tortugas marinas e incluso la extinción (Perrine, 2003).

La gran demanda de pescado de la sociedad actual y el consiguiente aumento de la pesca industrializada, ha sido el principal factor causante de un mayor número de muertes de ejemplares de tortugas marinas en todo el mundo y por lo tanto, del declive de sus poblaciones. Aunque todas las artes de pesca pueden atrapar tortugas marinas, hay tres que se distinguen especialmente por el alto número de capturas: arrastre de fondo, redes de deriva y palangre de superficie. Algunos países están aplicando técnicas y métodos de pesca que parecen disminuir estas capturas, como son el uso de anzuelos específicos (circulares en lugar de los tipo J) y de los dispositivos TED (turtle excluded device o dispositivo excluidor de tortugas) (Epperly, 2003; Lutcavage et al., 1997a; Seidel and McVea, 1995). Además, la implementación de observadores en barcos de pesca, o el cambio de cebo de pesca, han sido medidas de conservación en el hábitat marino. Estas tecnologías, han sido instauradas con éxito principalmente en países desarrollados del mundo y, aunque dependen en gran medida de la aceptación del sector pesquero y el grado de desarrollo del país, su uso está en expansión.

Además de la explotación directa y las capturas indirectas, existen otras amenazas antropogénicas que actúan sobre estos reptiles. El desarrollo urbanístico en las zonas costeras, donde las tortugas ponen sus huevos, puede impedir o reducir la nidificación, o bien reducir el éxito de eclosión (Lutcavage et al., 1997a). Los programas de conservación que se desarrollan *in situ* en poblaciones de todo el mundo son numerosos. Estos programas incluyen protección y monitorización de las playas de nidificación, de las hembras y de los nidos. Además desarrollan una importante labor de sensibilización a las poblaciones locales.

En las últimas décadas, el aumento del tráfico marítimo también ha conllevado efectos negativos directos e indirectos sobre todas las especies animales que habitan en este ecosistema, incluidas las tortugas marinas. Por un lado, algunos autores han descrito traumatismos, cortes y amputaciones en las tortugas (Calabuig and Liria, 2007; Margaritoulis, 2007; Orós et al., 2005) por colisiones directas con barcos u otras embarcaciones. Además, los vertidos accidentales o ilegales de petróleo suponen un gran riesgo para estas especies (Milton et al., 2003). El petróleo y sus derivados, así como otras sustancias tóxicas y residuos sólidos no degradables vertidos al mar, pueden circular por los océanos y acumularse en las zonas de convergencia y líneas de deriva. En estos mismos lugares, las corrientes oceánicas concentran los nutrientes que estimulan la proliferación del plancton y de otros organismos. Estas zonas constituyen los hábitats de alimentación de los juveniles de tortugas marinas durante la fase pelágica de su ciclo biológico. La ingesta de petróleo y de otros contaminantes ambientales puede producirles una grave intoxicación y posteriormente la muerte. Así, algunos autores han descrito la muerte por petróleo de tortugas marinas varadas en las costas de las Islas Canarias (Orós et al., 2005). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha estudiado la incidencia de tortugas varadas por petróleo en las costas de las Islas Canarias, mostrando una disminución en el número de tortugas varadas por esta causa a partir de la declaración de las aguas del Archipiélago como zona marítima especialmente sensible por la Organización Marítima Internacional (OMI) (Camacho et al., 2013a) **(ver Anexo I)**. Sin embargo, hoy en día las tortugas petroleadas siguen siendo una causa de varamiento en las costas del Archipiélago (Orós et al., 2013). Además los efectos crónicos a la exposición de estos contaminantes han sido escasamente estudiados (Lutcavage et al., 1997a).

Por otro lado, la ingestión de plásticos y de otros cuerpos extraños, que son confundidos con alimentos, puede originar lesiones y obstrucciones graves en el tracto digestivo (Lazar and Gracan, 2011; Orós et al., 2005; Torrent et al., 2002). Además, las tortugas pueden enredarse en la basura y desechos de los barcos como sacos de rafia, cabos y trozos de redes que causan amputaciones de miembros e incluso muerte por ahogamiento (Calabuig and Liria, 2007; Gibson and Smith, 1999; Orós et al., 2005). Además, el análisis retrospectivo de las causas de varamiento de tortugas marinas vivas en las costas de las Islas Canarias en la última década, muestra cómo la mayor parte de los animales vararon por razones derivadas de la actividad humana, siendo la causa más frecuente el



enmallamiento en las artes de pesca (50.98%) (Orós et al., 2013). Por otro lado, nos parece importante resaltar el importante número de tortugas que varan y se desconoce su causa (14.08%). La etiología de estos varamientos quizás esté vinculada con la creciente contaminación marina, aunque esta teoría debe ser todavía estudiada.

De forma indirecta, la contaminación química ambiental, no solo la causada directamente por el creciente tráfico marítimo sobre los océanos, sino también la contaminación derivada de numerosas sustancias químicas utilizadas por el hombre o la derivada de su propia actividad, es otro de los importantes factores que están influyendo negativamente sobre las poblaciones de tortugas marinas de diferentes maneras. Además, la contaminación ambiental va ligada al cambio climático que se predice en el próximo siglo (IPCC 2007). Los efectos negativos de este calentamiento global han planteado numerosas cuestiones, y las tortugas marinas no han quedado al margen (Poloczanska et al., 2009).

Además, el efecto inmunosupresor de numerosas sustancias químicas ha sido documentado en numerosos experimentos tanto de laboratorio como en animales de vida libre (Keller et al., 2000, 2005 y 2006). La aparición de algunas enfermedades en especies marinas ha sido relacionada con la contaminación ambiental (Lafferty et al., 2004). Algunos autores han hipotetizado que la alta prevalencia de tumores (fibropapilomas) en ciertas poblaciones de tortugas marinas está asociada a este efecto inmunosupresor de los contaminantes (Aguirre et al., 1994; Schumacher et al., 1998).

Aunque en menor medida que, por ejemplo la pesca incidental, las enfermedades naturales también ocasionan la muerte o debilitamiento de las tortugas marinas. Enfermedades con un origen nutricional, metabólico, bacteriano, parasitario, vírico o micótico han sido documentadas en estos reptiles (McArthur, 2004; Wyneken et al., 2006). Se han realizado en los últimos años importantes avances sobre ciertas patologías o causas de muertes naturales que acechan a estos organismos. Sin embargo, todavía no se tiene un buen conocimiento de muchas de sus enfermedades, ya que la mayoría de las tortugas estudiadas se encuentran muertas o la muerte no se puede atribuir a una causa particular.

Por otro lado, el estudio de parámetros clínicos, como valores hematológicos y bioquímicos, son fundamentales a la hora de poder diagnosticar e interpretar los procesos patológicos que afectan a estas especies. Aunque disponemos de una amplia revisión de valores fisiológicos de ciertos indicadores de salud en tortugas marinas, determinados parámetros bioquímicos han sido escasamente estudiados. Recientemente nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo un estudio encaminado a ofrecer un mayor conocimiento de parámetros bioquímicos indicadores del estado nutricional y del grado de deshidratación que padecen tortugas varadas en las Islas Canarias (Camacho et al., 2013c) (datos correspondientes al Capítulo I). Aunque las causas de varamiento fueron

en su mayoría motivadas por razones antropogénicas, el origen que llevó al varamiento de algunos animales debilitados de este estudio no fue identificado. Se ha observado un creciente ingreso de ejemplares severamente debilitados en algunos hospitales de tortugas marinas en la costa este de EE.UU. (Norton et al., 2005). Sin embargo, se desconocen las causas que originan que estos animales presenten estos cuadros típicos de anemia, leucocitosis (indicativa de infecciones bacterianas), deshidratación, hipoglucemia, severa caquexia y una gran carga de parásitos externos.

A pesar del enorme progreso realizado en las últimas cinco décadas en relación a la historia natural, biología y ecología de las tortugas marinas, son numerosas las incógnitas que aún deben ser investigadas. La contaminación ambiental y la aparición de enfermedades promovidas por cambios en el ambiente inducidos por el hombre han sido previamente sugeridas (Lafferty et al., 2004; Witham, 1995). Muchos son los efectos tóxicos ampliamente conocidos de sustancias xenobióticas en los seres vivos. Sin embargo, a pesar de que numerosos estudios han monitorizado sustancias químicas en las tortugas marinas, la evaluación de los potenciales efectos de los contaminantes ambientales sobre la salud de las poblaciones de tortugas marinas ha sido escasamente estudiada. Las tortugas marinas no han quedado aisladas de esta contaminación y por ello los estudios de monitorización de los niveles contaminación de sustancias químicas se encuentran entre las 20 cuestiones prioritarias para la conservación de las tortugas marinas a nivel mundial (Hamann et al., 2010), lo que ha motivado el planteamiento de esta Tesis Doctoral.

## 2. Parámetros hematológicos y bioquímicos de las tortugas marinas

Los parámetros clínicos proporcionan una herramienta diagnóstica y pronóstica fácil tanto en vertebrados superiores como inferiores (Campbell, 2004; Canfield, 1998; Tavares-Dias et al., 2009). Por lo tanto, el establecimiento de rangos normales de referencia de parámetros hematológicos y bioquímicos es considerado muy importante para la evaluación y seguimiento del estado de salud de los quelonios. Tales evaluaciones son dependientes de la existencia de los valores de referencia fiables para animales sanos. Recientemente, algunos estudios han aportado rangos normales de referencia tanto para quelonios de vida libre como para animales cautivos (Hidalgo-Vila et al., 2007; Knotková et al., 2002; Metin et al., 2006; Pires et al., 2006; Samour et al., 1998). Se ha descrito que tortugas criadas en cautividad pueden tener valores sanguíneos diferentes que tortugas salvajes (Bolten and Bjorndal, 1992; Chandavar and Naik, 2004; Santos et al., 2005), debido a la artificialidad de la dieta o a condiciones estresantes (Bolten and Bjorndal, 1992; Santos et al., 2005). Sin embargo, los estudios de valores fisiológicos sanguíneos de tortugas mantenidas en cautividad nos pueden proporcionar información sobre la salud de los animales y, por lo tanto puede ser utilizado como una herramienta de trabajo rápido para el diagnóstico (Pires et al., 2006).

El número de estudios llevados a cabo en tortugas marinas en las últimas décadas deja de manifiesto el gran esfuerzo en investigación y conservación que se viene desarrollando en este grupo de reptiles. Valores de referencia de parámetros sanguíneos en diferentes especies de tortugas marinas han sido publicados en distintas poblaciones de todo el mundo (Bolten and Bjorndal, 1992; Casal et al., 2009; Deem et al., 2009; Delgado et al., 2011; Flint et al., 2010; Gelli et al., 2009; Jacobson et al., 2007; Stamper et al., 2005; Swimmer, 2000). Sin embargo, ciertos parámetros bioquímicos como los electrolitos, gases sanguíneos y el estado ácido-base han sido escasamente estudiados en estas especies (Camacho et al., 2013c; Innis et al., 2007).

Los parámetros sanguíneos en quelonios y reptiles en general, son influenciados por muchos factores, condiciones ambientales, edad, sexo, estado de salud, sitios geográficos, estado fisiológico como la hibernación y reproducción (Christopher, 1999; Dickinson et al., 2002; Heard et al., 2004; Jacobson, 2007). De igual manera al resto de reptiles, las tortugas marinas son animales ectotérmicos, por ello los cambios estacionales en la temperatura se acompañan de cambios en su temperatura corporal (Lutz and Dunbar-Cooper, 1987). Algunos cambios observados en la bioquímica sanguínea de las tortugas marinas demuestran que las concentraciones de los iones internos se emplean para regular la actividad de las vías metabólicas sensibles a estos iones (Lutz, 1975). Por lo tanto, cuando se realice una interpretación de datos hematológicos o bioquímicos, se debe considerar la gran influencia que determinados factores externos tienen sobre la

fisiología normal y la salud de los vertebrados ectotérmicos en comparación con los vertebrados endotérmicos.

Por ejemplo, las hembras de iguana verde (*Iguana iguana*) grávidas presentan significativamente mayores concentraciones de calcio, fósforo, proteínas totales, colesterol y globulina que los machos, las hembras no grávidas y los juveniles. Además, las hembras grávidas presentan un ratio albúmina: globulina significativamente menor que los otros 3 grupos mencionados. Las hembras no grávidas presentan significativamente mayor calcio y colesterol que los machos. Los juveniles exhiben significativamente mayor concentración de glucosa, comparado con los adultos, y significativamente mayor calcio que los machos adultos (Harr et al., 2001). De igual manera, en tortugas marinas también se han demostrado diferencias significativas entre parámetros sanguíneos en función de la alimentación, zona geográfica y estado fisiológico (Casal et al., 2009; Deem et al., 2009). Además, diferencias en la condición y estado de salud de tortugas marinas varadas también deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los valores de parámetros sanguíneos (Anderson et al., 2011; Casal and Orós, 2009; Innis et al., 2007).

La evaluación de los parámetros hematológicos proporciona información rápida y útil para el clínico en reptiles (Jacobson, 2007; Tavares-Dias et al., 2009). Los parámetros hematológicos más frecuentemente determinados incluyen: recuento de glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC) y diferencial de leucocitos, así como el examen de la morfología de las células sanguíneas en frotis teñidos. De esta manera, los parámetros hematológicos son ampliamente utilizados para diagnosticar enfermedades en quelonios, evaluar el estado de salud de los individuos (Christopher et al., 2003; Joyner et al., 2006; Work and Balazs, 1999), y como un indicador pronóstico después del tratamiento (Knotkova et al., 2005). Muchas de las enfermedades (por ejemplo, hemoparasitosis, enfermedades inflamatorias) están asociadas con cambios en los parámetros hematológicos en quelonios.

Es importante tener en cuenta que para la recogida de la sangre destinada a la realización de tests bioquímicos se recomienda el uso de heparina de litio como anticoagulante. Además, se deben obtener el plasma en lugar del suero debido a que en reptiles la formación del coágulo puede demorarse mucho y resultar en cambios significativos en algunos valores bioquímicos del suero (especialmente los electrolitos) (Bolten et al., 1992). Por otra parte, también son importantes las diferentes técnicas desarrolladas por los laboratorios para las pruebas bioquímicas, debiendo ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos (Wolf et al., 2008).

Los valores bioquímicos sanguíneos frecuentemente usados en las tortugas marinas y en otros reptiles son: proteínas totales, albúmina, globulina, bilirrubina total, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferasa (AST), alanina

aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), creatinquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), calcio, fósforo, colesterol, triglicéridos, glucosa, hierro, sodio, potasio y cloro (Aguirre, 1996; Campbell, 1996).

Los cambios en los parámetros bioquímicos inducidos por diferentes condiciones patológicas son similares a los observados en los mamíferos, aunque existen diferencias (Heard et al., 2004). Los valores bioquímicos plasmáticos representan un buen instrumento diagnóstico para monitorizar el estado de salud de las tortugas marinas en estado silvestre (Aguirre et al., 1995; Bolten and Bjorndal, 1992).

El plasma de muchos quelonios sanos muestra una coloración amarillo-anaranjada. Esto puede ser el resultado de la ingestión de pigmentos carotenoides de plantas y no debería ser necesariamente interpretado como un indicativo de una anormal o excesiva degradación de la hemoglobina (Nakamura, 1980). Bolten y Bjorndal (1992) afirman que las tortugas verdes (*Chelonia mydas*) que presentan un plasma poco coloreado han estado alimentándose de forma carnívora en mar abierto, mientras que las que presentan un plasma amarillento son de tendencia herbívora.

La contaminación con linfa de las muestras sanguíneas obtenidas de los quelonios causa dilución en los parámetros LDH, ALP, ácido úrico y albúmina. La linfo dilución no presenta efectos sobre los resultados de la urea, fósforo o calcio. Como en otros reptiles, durante la foliculogénesis de las tortugas hembras, los niveles de calcio, fósforo, globulina y colesterol pueden observarse elevados (Raphael, 2003).

La evaluación de las respuestas hematológicas y bioquímicas a factores fisiológicos y ambientales, y estudios comparativos de las tortugas clínicamente sanas y enfermas proporcionan información detallada para su gestión y conservación. Esto es especialmente importante en especies en peligro de extinción, ya que dicha información se puede utilizar para planificar estrategias dirigidas a su conservación (Aguirre et al., 1995; Bolten and Bjorndal, 1992; Brenner et al., 2002; Casal et al., 2009; Casal and Orós, 2009).

### 3. La contaminación química global

En 1962, Rachel Carson escandalizó a la sociedad con las descripciones de cómo los contaminantes ambientales afectan a las poblaciones de vida silvestre. Desde entonces, numerosos autores han descrito las consecuencias fatales del uso de ciertos contaminantes químicos sobre la vida silvestre y por supuesto sobre los seres humanos. Cáncer, anomalías en el desarrollo, alteraciones reproductivas, inmunosupresión son algunos de los efectos conocidos de muchas sustancias tóxicas que se encuentran en los seres vivos provenientes del medio ambiente. Si bien nadie puede negar que los productos químicos aportan importantes beneficios para la sociedad, a través de su uso en la asistencia sanitaria por ejemplo, existen numerosas evidencias de que algunos de ellos están dañando la vida silvestre y por desgracia a los seres humanos.

En el momento actual se vive una crisis financiera mundial debido, probablemente, al modelo de vida por el que han apostado los países desarrollados en las últimas décadas de nuestra existencia. Este modo de vida del ser humano ha acarreado consecuencias fatales sobre nuestros ecosistemas y sobre todos los seres vivos de nuestro planeta. ¿Podemos seguir creciendo hasta el infinito en un planeta finito? El planeta padece un grado terrible de contaminación cuyas consecuencias afectan a nuestra propia salud. El concepto ético de "desarrollo sostenible" ha respondido inicialmente a la esperanza de un cambio de este modelo. Numerosos acuerdos y compromisos internacionales intentan mejorar nuestra futura calidad de vida. Sin embargo, la sociedad del siglo XXI, es hoy por hoy dependiente de productos químicos artificiales en prácticamente todo lo que nos rodea: de los plaguicidas a los cosméticos, desde biberones a los ordenadores, etc

Por un lado, el mundo de la alta tecnología ha experimentado una aceleración constante y progresiva en los últimos treinta años. Cada año, los fabricantes presentan nuevas maravillas técnicas para ganar posiciones en una carrera impuesta por las feroces leyes del mercado. Las novedades generan expectación y más de un consumidor no puede resistirse a cambiar de móvil, de ordenador o de reproductor de MP3 si el bolsillo se lo permite. Una de las consecuencias más inmediatas de este consumo exacerbado es que, cada año, más dispositivos electrónicos acaban en los contenedores de basura. Sólo en España, las familias producen más de 100.000 toneladas al año de **basura electrónica** (frecuentemente denominada con el término anglosajón *E-Waste*). Si a esa cantidad se le añaden los desechos que produce el sector de la electrónica, el resto de la industria y los establecimientos comerciales, se alcanza la cifra en toda España de 200.000 toneladas de desperdicios electrónicos al año. Se estima que la producción global de basura electrónica es de 20-25 millones de toneladas por año, siendo la mayor parte producida en Europa, Estados Unidos y Australasia. No obstante, China, los países de Europa del Este y Latinoamericanos se convertirán también en grandes

productores de basura electrónica durante los próximos diez años (Robinson, 2009). La basura electrónica contiene metales valiosos como el cobre o el platino, pero también numerosos contaminantes ambientales potenciales, especialmente plomo, estaño, mercurio, cadmio, níquel, difeniléteres polibrominados (PBDEs) y bifenilos policlorados (PCBs). Además, la incineración de la basura electrónica puede generar dioxinas, furanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), entre otros. Una gran mayoría de esta basura electrónica es desechada, aun actualmente, en los vertederos, ya que la tecnología de reprocesamiento efectiva, que recupera la mayor parte de los materiales minimizando el impacto ambiental, es muy cara. En consecuencia, pese a ser ilegal en el marco del Convenio de Basilea (UNEP 2009), los países ricos exportan cada año una cantidad desconocida de desechos electrónicos a los países pobres, donde las técnicas de reciclaje incluyen la quema y la disolución en ácidos fuertes con muy pocas medidas para proteger la salud humana y el medio ambiente (Cobbing 2008). Este tipo de "reprocesamiento" da como resultado inicial una fuerte contaminación local, pero que en breve plazo es seguida por la migración de los contaminantes a los acuíferos y finalmente a su incorporación a la cadena alimenticia. Los trabajadores del sector de los desechos electrónicos sufren efectos negativos en la salud por el contacto con la piel y la inhalación de estas sustancias (Qu et al., 2007), mientras que la comunidad en general está expuesta a los contaminantes a través del humo, polvo, agua potable y sobre todo de los alimentos (Chatterjee, 2007).

Por otro lado, otro gran sector de la industria química -el de los **productos plaguicidas**- ha contribuido enormemente en los últimos 70 años a incrementar los rendimientos del sector agrícola mediante el control de las plagas y enfermedades, y también el control de las enfermedades transmitidas por insectos (paludismo, dengue, encefalitis, filariasis, etc) (Abhilash and Singh, 2009). La necesidad de aumentar la producción de alimentos para la población mundial en rápido crecimiento es bien conocida y una de las estrategias para aumentar la productividad de los cultivos es el manejo efectivo de plagas ya que más del 45% de la producción anual de alimentos se pierde por la infestación de plagas. En los países tropicales las pérdidas en los cultivos son aún mayores debido a que las elevadas temperaturas y el alto grado de humedad dan lugar a la proliferación de las plagas, por lo que la aplicación de productos plaguicidas es muy intensa en estos países (Abhilash and Singh, 2009). Debido al uso y abuso de este tipo de productos se produce una considerable generación de residuos, lo cual repercute en el coste de los productos, pero sobre todo produce consecuencias adversas sobre la salud de los ecosistemas y del hombre. La aplicación inadecuada de plaguicidas afecta al medioambiente en su conjunto, haciendo que los residuos contaminen el suelo, el aire y las aguas y que finalmente alcancen la cadena alimentaria (UN/DESA 2002). De entre todos los grupos de insecticidas preocupan especialmente los insecticidas organoclorados como el diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorociclohexano (HCH), aldrina y dieldrina, ya que, aún hoy en día, se encuentran entre los plaguicidas más utilizados en los países en desarrollo de

África y Asia debido a su bajo coste, eficacia y versatilidad en la lucha contra plagas y los insectos vectores de enfermedades (Lallas, 2001). Sin embargo, debido a su potencial de bioacumulación y efectos biológicos, estos compuestos fueron prohibidos en los países desarrollados desde hace más de tres décadas (Luzardo et al., 2006; Zumbado et al., 2005). Su resistencia a la degradación ha dado lugar a la contaminación universal por estos compuestos que se encuentran en muchos compartimentos del medio ambiente. Según el inventario de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), más de 500.000 toneladas de plaguicidas obsoletos y no utilizados representan una amenaza real para el medio ambiente y la salud pública mundial.

Si bien hemos mencionado dos de los grandes sectores de la industria química, otro grupo de contaminantes que no podemos desligar es el de la **industria petroquímica**. En nuestras sociedades los modelos de producción están directa o indirectamente basados en el consumo de hidrocarburos. La energía que hoy se emplea mundialmente proviene, en su mayor parte, de la combustión de hidrocarburos; los medios de transporte (terrestres, aéreos y marítimos) los emplean como combustibles, y gran parte de la variada gama de productos plásticos se sintetizan a partir de ellos. La extrema dependencia alcanzada hacia los hidrocarburos por el mundo actual, y su elevado consumo, han traído aparejados problemas ambientales expresados en términos de contaminación atmosférica por sus productos de combustión, contaminación de aguas, derrames de petróleo y producción y acumulación de residuos no biodegradables (plásticos). Por otra parte, siendo el petróleo, el gas natural y el carbón recursos naturales no renovables, su consumo debería racionalizarse y muchas de sus aplicaciones, sobre todo la energética, sustituirse paulatinamente por fuentes ambientalmente más limpias y duraderas.

Por lo tanto, los PAHs han estado presentes como contaminantes desde los inicios de la vida del hombre, ya que son compuestos naturales presentes en el medio ambiente. Sin embargo, el crecimiento industrial ha supuesto un aumento de gran número de contaminantes en el entorno natural, entre ellos estos hidrocarburos. Existe un vínculo entre el cambio climático y los hidrocarburos, ya que la quema de combustibles fósiles es la principal fuente de emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera. Debido a la creciente preocupación sobre el calentamiento global del planeta, se han firmado acuerdos internacionales con el compromiso de disminuir las emisiones de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, cuyos niveles han aumentado de un modo alarmante durante las últimas décadas.

Toda esta situación de contaminación medioambiental con sustancias que producen efectos adversos sobre la salud es altamente preocupante y lógicamente no ha pasado desapercibida a las autoridades gubernamentales. Por este motivo, en el año 2006 la Unión Europea (UE) promulgó una ambiciosa y monumental iniciativa legislativa para el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las sustancias químicas (REACH). Había muchas razones para la



promulgación del REACH, pero en general es una extensión del deseo global de que se produzcan menos productos químicos industriales, de comprender los posibles riesgos humanos y ecológicos de los que ya existen, y de asegurarse de que no se produce ninguna nueva catástrofe o amenaza relacionada con el uso de las sustancias químicas (Williams et al., 2009). De acuerdo con esta directiva comunitaria, salvo unas pocas excepciones, es necesario el registro de todas las sustancias químicas fabricadas o importadas en la UE. Esta inscripción en el registro generará un expediente que contendrá datos sobre las características físico-químicas, así como las propiedades toxicológicas y ecotoxicológicas de cada una de las sustancias. Para muchos productos químicos, el examen de los peligros y riesgos derivados del uso de estas sustancias también se requerirá en forma de un informe de seguridad química. Comenzando con el doble proceso de expediente y la evaluación de sustancias, la Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA), los Estados miembros de la UE, y la Comisión Europea identificarán los productos químicos que representan riesgos inaceptables para la salud humana y/o el medio ambiente, y en consecuencia reducirán o restringirán su uso.

No obstante, a pesar de que REACH y otros acuerdos internacionales son una ambiciosa estrategia de cara al futuro, no resuelve el problema de los contaminantes que ya han sido vertidos y están en circulación en el medio ambiente. Por esto, varias organizaciones internacionales han desarrollado estrategias encaminadas a eliminar o reducir la producción, uso y liberación de las sustancias persistentes y bioacumulativas con efectos adversos para la salud, los denominados **contaminantes tóxicos persistentes (CTPs)**.

## 4. Características generales de los contaminantes tóxicos persistentes (CTPs)

Los CTPs son sustancias químicas o subproductos que poseen riesgos muy significativos para los seres vivos o los ecosistemas, y que debido a su resistencia a la degradación, permanecen durante largos periodos de tiempo en el medioambiente. Se trata de sustancias altamente liposolubles por lo que son capaces de bioacumularse en los tejidos humanos, animales o vegetales. Debido a esta **BIOACUMULACIÓN** las concentraciones medibles de estas sustancias aumentan según se suben peldaños en la cadena alimentaria, en un fenómeno conocido como **BIOMAGNIFICACIÓN** (Gray, 2002).

**Los criterios que debe cumplir un contaminante químico para ser considerado un CTP son:**

- Ser extremadamente estable y persistente en el medioambiente.
- Bioacumularse en los organismos vivos y en la cadena alimentaria.
- Ser tóxico para el ser humano y los animales y tener efectos crónicos sobre la salud tales como disrupción de los sistemas endocrino, inmune o reproductivo, y/o ser carcinogénicos.
- Ser transportados en el medioambiente a grandes distancias del punto donde fueron liberados.

Como consecuencia de todas estas características, muchas especies, y en particular las situadas en los eslabones más altos de la cadena trófica, están crónicamente expuestas a estas sustancias, incluso durante toda la vida. De esta manera los CTPs pueden alcanzar niveles muy altos en, por ejemplo, las focas y osos polares (Braune et al., 2005; Leonards et al., 2008).

Como veremos, los efectos adversos sobre la salud de los CTPs pueden ser muy graves, incluidos los efectos nocivos sobre la fertilidad y el desarrollo embrionario, el daño al sistema o el cáncer, por citar sólo algunos de los más graves (Noyes et al., 2009).

En la actualidad, la mayoría de los CTPs están prohibidos, severamente restringidos o rigurosamente gestionados en los países industrializados (Luzardo et al., 2006; Zumbado et al., 2005). Sin embargo, algunos de ellos todavía se fabrican y utilizan en los países en desarrollo y países con economías en transición. En particular, miles de toneladas de DDT se fabrican cada año en algunos países en desarrollo y los PCBs parecen seguir siendo producidos en algunos países, como por ejemplo la Federación de Rusia (Davies, 2006).

En principio, un CTP liberado en cualquier parte del mundo puede con el tiempo llegar a alcanzar cualquier otro lugar del planeta. Sin embargo, en términos

generales se produce una redistribución a gran escala de los CTPs desde las zonas más templadas a las zonas más frías del planeta, debido a un fenómeno que ha dado en llamarse “**efecto saltamontes**”. Básicamente los CTPs se propagan por evaporación a la atmósfera desde las regiones más templadas del planeta - los países tropicales, que es precisamente donde más se utilizan - a los más fríos, donde se depositan por condensación, de la misma manera que el vapor de agua del aire se condensa en forma de rocío en una noche de verano. De esta manera, estos compuestos pueden viajar miles de kilómetros desde el lugar en que son emitidos (Scheringer, 2009). Debido a que los países de las regiones circumpolares tienen grandes regiones con temperaturas anuales medias muy bajas, con una exposición muy limitada a la luz solar y una biosfera de pequeño tamaño, se produce un tasa muy pequeña de evaporación de los CTPs, que quedan “atrapados” allí, de forma que los seres humanos y los animales que habitan esas regiones tienden a acumular concentraciones inusualmente altas de CTPs es sus organismos, en particular en sus tejidos grasos (Scheringer, 2009). Por esta razón las primeras iniciativas tomadas para el control de estas sustancias partieron de los países industrializados situados más al norte, como Canadá y Estados Unidos.

De hecho, los riegos de los denominados CTPs fueron reconocidos por vez primera en 1978 por los gobiernos de los Estados Unidos y Canadá en el Acuerdo para la Calidad del Agua de los Grandes Lagos (Davies, 2006). Desde entonces se han desarrollado numerosas **estrategias nacionales o regionales para minimizar los riesgos de los CTPs**, que ya son considerados como una categoría química en sí misma. Sin embargo, aunque la actuación local puede disminuir la magnitud del problema, no puede solucionarlo completamente porque, como ya hemos mencionado, la contaminación química se distribuye globalmente y no conoce fronteras políticas.

Por otro lado, existe un desconocimiento muy grande acerca de las fuentes y emisiones de CTPs en muchos de los países en vías de desarrollo. Resulta paradójico el hecho de que, a pesar de que la mayoría de estos países en vías de desarrollo se encuentran localizados en las regiones templadas del planeta y que debido al efecto saltamontes deberían estar relativamente descargados de CTPs, los datos que han podido ser recogidos a partir de poblaciones humanas o de muestras de fauna silvestre de África y otras regiones, muestran que en ellas existen niveles de contaminantes iguales o incluso superiores a las de las regiones más frías del planeta (Weber et al., 2008; Wikteliu and Edwards, 1997). Hay varias razones que explican este hecho. En primer lugar, gran parte de los CTPs son sustancias plaguicidas de enorme eficacia. Además, son productos muy baratos, fáciles de utilizar y son percibidos como seguros, ya que paradójicamente no son muy tóxicos de forma aguda. Por todo ello, se convierten en una alternativa rápida, barata y efectiva para la subsistencia de miles de familias de granjeros con bajo nivel cultural, y desprovistas de equipamiento y productos modernos. Este uso se ve facilitado además por el hecho de que los controles fronterizos de mercancías en estos países son habitualmente ineficaces, lo cual podría permitir un comercio ilegal de plaguicidas prohibidos (Mansour, 2004; Ssebugere et al., 2010).

Otro problema común en muchos países tropicales es el ocasionado por las graves enfermedades transmitidas por determinados insectos. Así el DDT ha sido recomendado como parte esencial del arsenal de insecticidas disponibles para la fumigación de interiores mientras no haya otras alternativas igual de eficaces para el control de los vectores de enfermedades tan graves como la malaria. Actualmente 14 países usan el DDT para el control de la diseminación de enfermedades y otros tantos están planteándose reintroducirlo (Guimaraes et al., 2007; van den Berg, 2009).

Pero en muchos casos el problema trasciende a estas cuestiones, porque aunque los gobiernos de estos países en vías de desarrollo quieran sumarse o se hayan sumado ya a las iniciativas internacionales que promulgan la prohibición y eliminación de los CTPs, aún queda el problema de la gestión de los plaguicidas y productos prohibidos ya fabricados. Algunos países han establecido inventarios de existencias de **plaguicidas obsoletos** con el apoyo de la FAO. En algunos casos estas reservas han sido destruidas o eliminadas, a veces por su exportación a países industrializados con las instalaciones de incineración apropiadas. Pero los productos químicos obsoletos son a menudo difíciles de identificar, debido a las condiciones de almacenamiento inadecuadas, las fugas y pérdida de etiquetado, por lo que la cantidad real de estas sustancias que están descontroladas es desconocida, convirtiéndose así en una fuente constante de emisión medioambiental (Felsot et al., 2003; Haylamicheal and Dalvie, 2009).

De todo lo expuesto se deduce que, mientras en algunas regiones del mundo se sigan utilizando, los CTPs encontrarán su acomodo en el medioambiente y permanecerán en él durante largo tiempo. Incluso si la producción de estas sustancias cesara de inmediato a escala global, el problema seguiría existiendo durante varios años o quizá décadas. Quiere esto decir que ningún país puede solucionar el problema de los CTPs por sí sólo. Debido a que estas sustancias son "emigrantes sin pasaporte" las regulaciones nacionales necesitan apoyarse en acuerdos y medidas globales para poder resolver el problema.

Por este motivo, en el marco del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) el 23 de mayo de 2001 se elaboró el *Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes* (2001). A este Convenio se adhirieron inicialmente 90 naciones, incluyendo entre ellas a España (United Nations Environment Programme, 2001a y 2001b). Como veremos en el siguiente apartado, en este Convenio se habla exclusivamente de compuestos de naturaleza orgánica, y es que cuando se habla de CTPs deben considerarse por separado aquellos que contienen átomos de carbono en su estructura molecular, llamados **contaminantes orgánicos persistentes (COPs)** de aquellos cuya naturaleza es inorgánica (básicamente, metales y metaloides), que en esta Tesis Doctoral denominaremos **contaminantes inorgánicos persistentes (CIPs)**. En esta introducción también los consideraremos por separado.

## 4.1. Contaminantes orgánicos persistentes (COPs)

El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes entró en vigor el 17 de mayo de 2004 y hasta el 28 de febrero de 2007, eran 142 las Partes que figuraban en él. El objetivo del Convenio de Estocolmo sobre COPs puede resumirse de la siguiente manera:

*“Proteger la salud humana y el medio ambiente de contaminantes orgánicos persistentes, reduciendo o eliminando sus emisiones en el medio ambiente.”*

Bajo este Convenio, los países firmantes confían en reducir y/o eliminar la producción y el uso, en primera instancia, de los 12 CTPs más prioritarios, conocidos comúnmente como la “docena sucia”, y establecen un mecanismo por el cual otros COPs se pudieran agregar al Convenio en el futuro, como de hecho ya se hizo en la cuarta reunión de las partes en el año 2009, tras la cual la lista inicial quedó ampliada a 9 sustancias más (United Nations Environment Programme, 2001c). El Convenio permite ciertas exenciones a la eliminación/reducción de la producción o uso de tales sustancias y, por tanto, a las normas relativas a la importación y exportación. Las exenciones que pueden preverse son características de cada COP y se especifican en los Anexos del Convenio. Las exenciones figuran en un registro accesible al público y son válidas durante un período de cinco años, pudiendo ser renovadas por la Conferencia de las partes con arreglo a un informe presentado a la Conferencia por la Parte interesada en el que se justifique que esa exención sigue siendo necesaria. Con el fin principal de reducir y/o eliminar los COPs, el Convenio de Estocolmo contiene:

- Medidas para eliminar o para restringir la producción, el uso y el comercio de los COPs producidos intencionadamente.
- Desarrollo de planes de acción para localizar la liberación de subproductos inintencionados de COPs, junto con la obligación de utilizar las mejores técnicas disponibles para reducir sus emisiones mediante instalaciones nuevamente construidas.
- Medidas para reducir o eliminar la liberación de COPs desde lugares de almacén y abandono.
- Posibilidad de ayuda técnica y financiera a los países en vías de desarrollo, y a los países con economías en transición para que ejecuten las obligaciones del Convenio.
- Criterios y procedimientos basados en la ciencia para la adición de otros COPs al Convenio.

Así, la lista de COPs que se consideran actualmente es la siguiente:

**En el Anexo A - Sustancias que deben ser eliminadas** (las partes deben tomar medidas para eliminar la producción y el uso las sustancias listadas en este anexo) se incluyen plaguicidas (**aldrina, clordano\*, clordecona, dieldrina, endrina,**

**heptacloro, HCH\*, mírex, hexaclorobenceno (HCB) y toxafeno\*)** y productos químicos industriales (**hexabromodifenileter y heptabromodifenileter, PCBs\*, hexaclorobenceno, pentaclorobenceno, tetrabromodifenileter y pentabromodifenileter**).

**En el Anexo B - Sustancias de uso restringido** (las partes deben tomar medidas para restringir la producción y el uso de las sustancias incluidas en esta lista) se incluyen plaguicidas (**DDT\***) y productos químicos industriales (**sulfonatos de perfluorooctano y sustancias perfluoroalquiladas**).

**En el Anexo C - Disminución de las emisiones de sustancias de producción no intencionada** (las partes deben tomar medidas para reducir la liberación de los productos químicos enumerados con el objetivo de minimizar la continuación de los mismos, y, cuando sea factible, la eliminación de dicha liberación) se incluyen subproductos industriales no intencionados (**dibenzo-para-dioxinas policloradas (PCDDs\*) y dibenzofuranos policlorados (PCDF\*), HCB, pentaclorobenceno, PCBs\* y PAHs**).

\* Tanto el clordano, como el DDT, HCH, PCBs, PCDD, PCDF y el Toxafeno son mezclas de congéneres, en ocasiones cientos de ellos.

A día de hoy, hay otras sustancias químicas que han sido propuestas para ser incluidas en el Convenio y están bajo revisión. Este es el caso, por ejemplo, de las parafinas cloradas de cadena corta, el plaguicida endosulfán y el compuesto industrial, hexabromociclododecano.

Cabe destacar que el Convenio de Estocolmo recoge también la necesidad de realizar acciones tendentes a verificar la efectividad de las medidas propuestas para la reducción/eliminación de los COPs. Así, el artículo 11.1.b. del Convenio expone que: *“las partes (países firmantes del convenio) alentarán y/o efectuarán las actividades de investigación, desarrollo, vigilancia y cooperación adecuadas respecto de los COPs y su presencia, niveles y tendencias en las personas y el medio ambiente”*, lo que se traduce, en **la justificación de la determinación y cuantificación (monitorización) de estos COPs en alimentos, matrices ambientales y seres vivos incluyendo los seres humanos**.

En su Guía para el plan de vigilancia mundial de COPs, el PNUMA, considerando que puede no ser necesario, o ni siquiera posible, analizar todos y cada uno de las sustancias y congéneres, recomienda analizar las sustancias listadas en la **Tabla 1** (PNUMA 2007). Se trata de los COPs precursores o determinados congéneres precursores y de algunos productos de transformaciones que son de interés para que los programas de vigilancia puedan servir de apoyo a las evaluaciones de eficacia. Para los PCBs, se recomienda realizar análisis de los considerados marcadores de exposición (M-PCBs, 7 congéneres) y dar información sobre los siete congéneres por separado, así como de la suma de todos ellos.

**Tabla 1. Analitos recomendados por la Guía para el Plan de Vigilancia Mundial de COPs.**

Sustancia	COPs precursores	Productos de transformación
Aldrina	Aldrina	
Clordano	<i>cis-</i> y <i>trans-</i> clordano	<i>cis-</i> y <i>trans</i> nonacloro, oxiclordano
DDT	4,4'-DDT, 2,4'-DDT	4,4'-DDE, 2,4'-DDE, 4,4'-DDD, 2,4'-DDD
Dieldrina	Dieldrina	
Endrina	Endrina	
Heptacloro	Heptacloro	Heptacloro epóxido
Mirex	Mirex	
HCB	HCB	
	$\Sigma$ M-PCB (7 congéneres: 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180)	
PCBs	$\Sigma$ DL-PCB (12 congéneres: 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 y 189)	
PCDDs y PCDFs	PCDDs/PCDFs sustituidos en 2,3,7,8 (17 congéneres)	
Toxafeno	Congéneres P26, P50, P62	

En este trabajo de Tesis Doctoral hemos incluido la mayor parte de las sustancias recomendadas por esta Guía. Sin embargo, algunas de estas sustancias como las dioxinas (PCDDs) y furanos (PCDFs) no han sido estudiadas. Por otro lado, sí han sido incluidos otros COPs como los PAHs, recogidos en el Anexo C del Convenio de Estocolmo.

Los COPs pueden clasificarse en dos grandes subgrupos atendiendo a la presencia o ausencia del cloro en su estructura química. Los derivados clorados generalmente son los más resistentes a la degradación y se han producido, empleado y liberado de una manera más amplia. Son compuestos químicos orgánicos con átomos de cloro, es decir, compuestos cuya estructura principal está formada por una cadena de átomos de carbono, y como grupos sustitutos destaca el átomo de cloro; en algunos casos asociados a átomos de oxígeno y azufre.

Las causas que han llevado a una elevada manufacturación de los compuestos organoclorados hasta su prohibición en determinados países son varias, destacando su importante papel como insecticidas y como aislantes en equipamientos eléctricos (De Voogt and Brinkman, 1989; Who, 1976).

De cara a facilitar la descripción de las características de los compuestos organoclorados seleccionados para este trabajo de Tesis Doctoral, abordaremos su estudio por separado, dividiéndolos en: 1) Plaguicidas organoclorados y 2) Dioxinas y compuestos análogos.

El otro grupo de compuestos orgánicos analizado es el de los PAHs, el cual describiremos separadamente en tercer lugar, por la ausencia de cloro en su estructura química.

#### **4.1.1. Plaguicidas organoclorados**

Bajo el nombre de plaguicidas organoclorados (POCs) se agrupa un número considerable de compuestos sintéticos cuya estructura química, en general, corresponde a la de los hidrocarburos clorados, aunque, además de cloro, algunos de ellos poseen oxígeno o azufre o ambos elementos en su estructura. Los compuestos organoclorados fueron los primeros insecticidas orgánicos utilizados a gran escala. Anteriormente sólo se usaban insecticidas naturales, tales como la nicotina, el azufre, la rotenona (extraída de una planta llamada derris), o el piretro (extraído de las cabezas florales de los crisantemos). Entre sus propiedades destacan su reducida volatilidad, alta estabilidad química y solubilidad en lípidos, lenta biotransformación y degradación en el medio ambiente, así como una notable resistencia al ataque de los microorganismos (Matsumoto et al., 2009). Estas propiedades, que les hacían enormemente atractivos, son también las que en última instancia han provocado su prohibición en numerosos países, pues constituyen el fundamento de los problemas que plantean al medio ambiente: persistencia, bioacumulación y biomagnificación en seres vivos (animales y humanos), transporte de largo alcance y toxicidad, características propias y comunes de todos los COPs y que llevaron a la inclusión de la mayoría de estos plaguicidas en el Convenio de Estocolmo.

Hay que destacar que las restricciones impuestas en el uso de estos compuestos organoclorados se han traducido en un marcado descenso en la concentración media de estos plaguicidas en tejidos humanos, como pone de manifiesto el caso del DDT. En la década de 1960, la concentración media en tejido adiposo en los habitantes de Estados Unidos era de 5 ppm, mientras que en 1990 se encontraba ya a niveles unas 100 veces inferiores. Sin embargo, estudios recientes realizados en nuestro país demuestran que, 35 años después de su prohibición, aún es posible medir su principal metabolito, el DDE, en la sangre de la práctica totalidad de los individuos adultos sanos y el DDT en cerca del 30% de la población (Jakszyn et al., 2009; Luzardo et al., 2006; Zumbado et al., 2005), e incluso en el líquido amniótico (Luzardo et al., 2009). Este hecho no es sorprendente ya que su uso persiste, o incluso ha sido reintroducido tras un periodo de prohibición, en países en vías de desarrollo, donde desempeñan un importante papel como agentes de control de organismos vectores (malaria en algunos países de África y Sudamérica) y aún como insecticida de uso agrícola.



Al igual que el resto de organoclorados considerados en este apartado, la tendencia a la biomagnificación y persistencia ambiental de los insecticidas organoclorados hace que estén sujetos a amplios ciclos de transporte en toda la biosfera. De esta forma, se han encontrado niveles relativamente altos de un cóctel de insecticidas organoclorados en el tejido adiposo de humanos y también animales como focas, morsas, ballenas y peces capturados en el círculo polar ártico (Hoekstra et al., 2005; Leonards et al., 2008).

Entre 1954 y 1961, en Sheldon (EE.UU.), se pulverizaron las tierras con DDT para acabar con una invasión de escarabajo japonés, y con ello se inició un proceso de fatales consecuencias. Los escarabajos agonizantes atrajeron a los pájaros insectívoros, la lluvia arrastró los componentes químicos afectando a las lombrices y se contaminaron los charcos donde bebían diferentes aves. Ardillas, ratas almizcleras, conejos o zorras tigrillo fueron los siguientes en morir. Los pájaros que sobrevivieron quedaron estériles, ya que el DDT impide que la cáscara de los huevos se endurezca, con lo que se rompían antes de su ciclo natural (Krantz et al., 1970; Mulhern et al., 1970). Los gatos desaparecieron. A medida que el DDT iba escalando niveles tróficos, aumentaba su concentración en tejidos animales. Esta realidad fue destapada en 1962 por la bióloga norteamericana Rachel Carson en su libro "*La Primavera Silenciosa*", best-seller que fundó las bases del ecologismo moderno (Carson et al., 1962; Jaga and Brosius, 1999). Por primera vez se habló del peligro de usar DDT y otros productos químicos usados como plaguicidas. Lo más alarmante no era únicamente su toxicidad, sino también su capacidad para persistir en los organismos por medio de la acumulación en los tejidos grasos. Rachel Carson escogió el título para su libro porque quiso remarcar que, de seguir así, podríamos vivir una primavera sin pájaros, silenciosa. Con la publicación de sus trabajos se inició un amplio debate que condujo finalmente a la prohibición del uso del DDT y muchos otros insecticidas organoclorados en muchos países, así como su inclusión en todas las listas de regulación de CTPs que se han ido promulgando y, por supuesto, si bien con un retraso de 40 años, finalmente en el Convenio de Estocolmo.

#### 4.1.1.1. Clasificación y propiedades físico-químicas

Atendiendo a su estructura, modo de síntesis u otras propiedades comunes a un grupo de ellos, se han propuesto varias clasificaciones para los insecticidas organoclorados. Presentamos la clasificación y las propiedades físico-químicas (O'Neil, 2006) según su estructura química de los compuestos analizados en esta tesis doctoral:

**Compuestos poliaromáticos clorados (DDT, Metoxicloro):** El DDT es prácticamente insoluble en agua a 25°C. Sin embargo es moderadamente soluble a soluble en numerosos disolventes orgánicos, tales como hidrocarburos aromáticos, alifáticos, cetonas y alcoholes. Su presión de vapor es baja ( $1,9 \times 10^{-7}$  mm Hg a 20°C) por lo que se considera no

volátil, pero puede pasar al aire a partir del suelo de manera continua, sobre todo en presencia de agua. En presencia de luz ultravioleta, el DDT pierde ácido clorhídrico y se transforma en DDE, compuesto que carece de acción insecticida, pero conserva todo el resto de propiedades. El resto de los plaguicidas poliaromáticos clorados tienen características similares a las del DDT.

**Cicloalcanos clorados (Hexaclorociclohexano):** El hexaclorociclohexano técnico (HCH) es una mezcla de 8 isómeros, entre los cuales el isómero conocido como gamma HCH o lindano está presente en una proporción del 10-18%. Es precisamente este isómero el que le confiere las propiedades insecticidas a la mezcla, pues los demás isómeros del HCH apenas poseen efecto tóxico agudo sobre los insectos y otros organismos. Debe mencionarse, sin embargo, que hay numerosos estudios que identifican al isómero beta HCH como promotor del cáncer de mama (Wong and Matsumura, 2007; Zou and Matsumura, 2003). El lindano (*gamma* HCH) es moderadamente soluble en agua (10 mg/l) y más soluble en acetona, cloroformo y etanol. Su presión de vapor es baja ( $9,4 \times 10^{-6}$  mm Hg a 20°C). Es estable a la acción de la luz solar, del oxígeno del aire, del calor y de los ácidos concentrados. Sin embargo, en medio alcalino se descompone y libera con facilidad ácido clorhídrico.

**Compuestos ciclodiénicos clorados (Aldrina, Dieldrina, Endrina, Heptacloro, Endosulfán, Clordano, Mirex):** El clordano técnico es una mezcla de diferentes hidrocarburos clorados, estrechamente relacionados por sus estructuras: en teoría contiene 70% de cis-clordano, 25% de trans-clordano, 1% de heptacloro y el 4% restante de una mezcla de otros compuestos. Su volatilidad es intermedia entre la del lindano y la del DDT. Es prácticamente insoluble en agua y soluble en éteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Es relativamente estable ante los ácidos, mientras que en medio alcalino libera ácido clorhídrico con facilidad.

De manera similar, el heptacloro y el endosulfán tienen limitada solubilidad en agua: se disuelven preferentemente en cloroformo, tetracloruro de carbono, xileno y otros disolventes orgánicos y son moderadamente solubles en etanol. Son estables ante la humedad, el aire y el calor y no se degradan por la acción de la luz ultravioleta. El heptacloro es moderadamente estable en presencia de agua, ácidos, bases y agentes oxidantes. En el ambiente se transforma para dar su epóxido, el cual es todavía más estable. El endosulfán es sensible a los ácidos y a las bases y, en presencia de agua, se hidroliza, dando lugar a endosulfandirol, el cual carece de acción insecticida.

La aldrina tiene un punto de fusión entre 104 y 104,5°C y una presión de vapor baja ( $7,5 \times 10^{-5}$  mm Hg a 20°C). Es muy poco soluble en agua.

Este compuesto es estable ante los ácidos débiles, las bases y el calor y es sensible a la acción de la luz ultravioleta. En presencia de ácidos fuertes y tras su biotransformación en los seres vivos se transforma en dieldrina, la cual es mucho más estable. La dieldrina y endrina poseen características físicoquímicas similares a las de la aldrina.

El mírex forma cristales incoloros con un punto de fusión de 485°C y una presión de vapor muy baja. Es prácticamente insoluble en agua, pero moderadamente soluble en benceno, tetracloruro de carbono, xileno y otros disolventes orgánicos. En condiciones ambientales es extremadamente estable y persistente.

**Bencenos policlorados (pentaclorobenceno, hexaclorobenceno):** El hexaclorobenceno es un sólido blanco cristalino que no ocurre en forma natural en el medio ambiente. Tiene un punto de fusión de 231°C y una presión de vapor de 0.1 mm Hg a 20°C. Es prácticamente insoluble en agua y muy soluble en disolventes orgánicos, como hexano, benceno, cloruro de metileno, etc. En condiciones ambientales es extremadamente estable y persistente. Además de haber sido utilizado hasta el año 1965 como plaguicida, se forma espontáneamente a partir de otros compuestos orgánicos policlorados, como subproducto industrial y en la combustión de residuos sólidos urbanos. El pentaclorobenceno tiene unas características muy similares a las del hexaclorobenceno.

#### 4.1.1.2. Parámetros toxicocinéticos

Como ocurre con todas las sustancias químicas, la toxicidad de los organoclorados depende de la absorción, distribución, metabolización y eliminación:

**Absorción:** Los POCs (con algunas excepciones) pueden ser absorbidos de forma tópica u oral de forma muy rápida debido a la alta liposolubilidad de estos compuestos (Marth et al., 1989). Actualmente, la vía principal de exposición a estos compuestos es la oral, a través de los alimentos, principalmente los más ricos en grasas animales. Como hemos visto los POCs no son altamente volátiles así que la inhalación no es una ruta normal de exposición (Jaeger et al., 1975).

**Distribución:** En el organismo, la distribución de los POCs se hace al hígado, riñón, cerebro y principalmente al tejido adiposo (Tao et al., 2009). En el medioambiente, al igual que todos los hidrocarburos tratados con cloro, lo que les confiere una alta liposolubilidad, se distribuyen igualmente a los tejidos grasos de los seres vivos; consecuentemente ocurre la bioacumulación en la cadena alimentaria, y por consiguiente en animales (Backer et al., 2001) y seres humanos (Pandit et al., 2002; Smith and Gangolli, 2002).

**Metabolización:** Los compuestos poliaromáticos clorados, tales como el DDT, son declorinados mediante oxidasas de función mixta (MFOs), si bien no todos con la misma eficacia. Así, el metoxicloro es rápidamente eliminado comparado con el DDT por decloración y oxidación. Los ciclodienos tales como la endrina son rápidamente convertidos en epóxidos mediante las MFOs. Los bencenos policlorados, como el pentaclorobenceno experimentan glucuronidación y sulfoconjugación. Como vemos, existen varias rutas de biotransformación de los POCs, pero en general, salvo algunas excepciones como es el caso del lindano, la degradación metabólica de estos plaguicidas tiene lugar muy lentamente, debido a la presencia de múltiples átomos de cloro como sustituyentes, muy difíciles de eliminar por mecanismos enzimáticos, y a las estructuras aromáticas complejas que presentan algunos de estos compuestos. El lento ritmo de metabolismo junto con la elevada liposolubilidad dan lugar al almacenamiento prolongado en el tejido adiposo, del que se movilizan muy lentamente para restaurar el equilibrio entre tejidos y sangre a medida que progresa la transformación metabólica y la excreción.

**Excreción:** La mayor ruta de excreción de los organoclorados es mediante la bilis al tracto digestivo y consecuentemente puede ocurrir la recirculación enterohepática. Los metabolitos son también lipofílicos, con lo que se almacenan en el tejido adiposo y pueden distribuirse nuevamente (Tanabe and Kunisue, 2007). La vida media de algunos difenilalifáticos tales como el DDT y los ciclodienos puede ser desde varios días hasta varios meses/años. La eliminación puede a veces ser explicada por un modelo de dos compartimentos, donde la primera fase es una eliminación rápida y la segunda, una eliminación más prolongada (Daly et al., 2007; Tanabe and Kunisue, 2007).

#### 4.1.1.3. Mecanismo de acción y toxicidad

Cuando hablamos del mecanismo de acción tóxica de los POCs hay que distinguir claramente entre el mecanismo que produce la toxicidad aguda (responsable de la amplia utilización que durante décadas han tenido estos compuestos en el control de plagas) y los mecanismos de toxicidad a largo plazo, comunes además a gran parte del resto de CTPs, que se producen tras la exposición inadvertida a bajas concentraciones de estos compuestos durante toda la vida. Gran parte de los efectos adversos que tiene sobre los seres vivos la exposición crónica a dosis bajas de estas sustancias, han sido encuadrados en el fenómeno denominado disrupción endocrina. Los mecanismos de toxicidad crónica se exponen más adelante conjuntamente con el resto de CTPs.

Así hay varios mecanismos de toxicidad aguda de los POCs. Un mecanismo común a todos ellos es la interferencia con el arco reflejo que se establece entre

los nervios sensoriales, el sistema nervioso central y los nervios motores, que activan la respuesta muscular a los estímulos externos (Mariussen and Fonnum, 2006). En insectos o mamíferos intoxicados por acción del DDT o compuestos similares, se observan temblores y convulsiones persistentes, lo que sugiere una descarga repetida de las neuronas. El estudio de la conducta eléctrica de las fibras nerviosas muestra que los POCs inducen un alargamiento considerable de la fase descendente del potencial de acción, manteniendo así a la membrana de la neurona en un estado parcialmente despolarizado, muy susceptible a una nueva despolarización total ante los menores estímulos. Esta modificación del comportamiento eléctrico de las células nerviosas se produce por varios mecanismos, interfiriendo con el transporte activo de sodio hacia el exterior del axón durante la repolarización (Mariussen and Fonnum, 2006; Narahashi, 2002). El DDT, además, inhibe la calmodulina, necesaria para el transporte de iones calcio, a su vez imprescindible en la secreción de neurotransmisores en la sinapsis. También inhibe la adenosina trifosfatasa (ATPasa) de las neuronas, en particular las bombas de sodio, potasio y calcio, esenciales en la repolarización (Janik and Wolf, 1992).

Los clorobenzenos, clorociclohexanos y clorociclodienos también son inhibidores potentes de las bombas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en las membranas de las neuronas, provocando potenciales de acción disminuidos (Mariussen and Fonnum, 2006; Narahashi, 2002). Pero estos plaguicidas actúan también por estimulación del sistema nervioso central, ya que son antagonistas del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), con lo que bloquean el paso de iones cloruro inducido por este neurotransmisor (Coats, 1990; Sunol et al., 1998). El mecanismo inhibitorio de GABA explica los efectos colinérgicos (sobreestimulación mediada por la acetilcolina) de la dieldrina y del lindano en varias especies. A diferencia del DDT, para el que existen pocos casos de intoxicación con resultado de muerte, los clorociclodienos han sido causantes de numerosas muertes, además de ser muy persistentes y tóxicos para el medio ambiente. Se absorben rápida y eficazmente por vía cutánea, lo que contribuye a la mayor toxicidad que se ha observado en exposiciones ocupacionales.

Además de los efectos sobre el sistema nervioso ya comentados, la exposición a lindano y al llamado lindano técnico (una mezcla de todos los isómeros del HCH) produce efectos tóxicos sobre el hígado y los túbulos renales, aunque se desconoce el mecanismo de toxicidad sobre estos órganos (Reddy et al., 1994; Srinivasan et al., 1984).

Los efectos tóxicos agudos de los POCs han sido clasificados como primarios y secundarios. El efecto primario es aquel por el cual el plaguicida actúa directamente sobre una especie dada, matándola o reduciendo sensiblemente su población. El efecto es secundario si el plaguicida no actúa directamente sobre la especie, pero destruye su sustrato o su hábitat y la pone seriamente en peligro de desaparición (Milne, 1995).

## 4.1.2. Dioxinas y compuestos análogos a las dioxinas

Bajo el nombre genérico de dioxinas y compuestos análogos se engloba a un grupo de sustancias químicas complejas que se caracterizan por tener varios aspectos en común, entre ellos, contener cloro en sus moléculas y una alta liposolubilidad, lo que las convierte en sustancias estructural, ambiental y biológicamente persistentes, además de acumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica (Van den Berg et al., 1998; Van den Berg et al., 2006). Tanto por sus características similares como por sus bien conocidos efectos tóxicos, nos parece importante mencionarlos en su conjunto. De hecho, las dioxinas son ampliamente conocidas por su potente capacidad carcinogénica, estando incluidas en el Grupo I de sustancias de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC). Aunque, como ya dijimos, en el presente trabajo se analizaron únicamente los PCBs, análogos de las dioxinas, y es de ellos de los que hablaremos más en profundidad.

Las dioxinas son un grupo de microcontaminantes de origen antropogénico ampliamente distribuidos en el medio ambiente. No tienen uso alguno, pero se forman espontáneamente en multitud de procesos industriales, como la manufactura de ciertos productos químicos, procesos industriales como la fabricación de PVC, la incineración de residuos sólidos urbanos o el blanqueo de la pulpa de madera en la fabricación de papel. A diferencia de éstas, que aparecen como subproductos indeseables, los PCBs fueron intencionadamente fabricados. Los primeros compuestos de PCB fueron sintetizados en 1864 por Schmidt y Schultz. Sin embargo, su producción comercial para una gran variedad de aplicaciones, comenzó mayoritariamente por la compañía Monsanto en los Estados Unidos en 1929 y se extendió hasta 1977 (Headrick et al., 1999). Debido a sus características físico-químicas como son su alta estabilidad, inercia y características dieléctricas, que eran ventajosas para muchos propósitos industriales, los PCBs fueron utilizados para una gran variedad de usos; en sistemas cerrados tales como transformadores eléctricos, condensadores y sistemas de traspaso térmico (en todos ellos como retardantes de llama para evitar el incendio de dichos aparatos), así como también, en sistemas hidráulicos. Durante un tiempo, los PCBs también tuvieron otra variedad de usos, puesto que fueron utilizados en formulaciones de pinturas, polímeros, pegamentos, lubricantes, plastificantes, formulaciones de plaguicidas y como agentes para la suspensión de pigmentos en el papel de copia sin carbón (Headrick et al., 1999; Safe, 1990).

Los PCBs dejaron de fabricarse en todo el mundo en 1983. Tales restricciones han derivado en una disminución en la concentración de PCBs en animales silvestres desde entonces, cuando se hallaron concentraciones por encima de los 100 mg/kg en peces de ecosistemas altamente contaminados (Brown et al., 1985). Se estima que de los dos millones de toneladas que se fabricaron en el pasado, un 31%, 370.000 toneladas, todavía están presentes en el medioambiente global, donde todavía no han sufrido degradación, tal es su persistencia. Además, todavía más

preocupante, si cabe, es el hecho de que unas 780.000 toneladas más siguen aún funcionando en equipos eléctricos antiguos, lo que significará, si no se le pone remedio, una fuente futura de descarga medioambiental cuando estos equipos sean desechados.

Los PCBs son eliminados de la atmósfera mediante procesos físicos tales como deposiciones secas o húmedas, absorción de vapores y depósitos en suelos, aguas superficiales y superficies de plantas. La mayor parte de los PCBs que se depositan en las aguas superficiales se absorben sobre los sedimentos suspendidos en el agua. Una vez unidos al suelo y al sedimento, estos químicos quedan generalmente ahí fijados, a excepción del transporte a granel debido a la erosión del suelo (Dickson and Buzik, 1993).

#### 4.1.2.1. Clasificación y propiedades físico-químicas

Son una serie de compuestos organoclorados, que constituyen una serie de 209 congéneres, los cuales se forman mediante la cloración de diferentes posiciones del bifenilo, 10 en total. Cada posición puede ser sustituida por un átomo de cloro. Si las posiciones 2, 2', 6 y 6' no tienen ningún cloro los bifenilos se mantienen coplanares, hablando por tanto de PCBs coplanares o no-orto. Si tenemos una posición sustituida en cada lado, son PCBs mono-orto sustituidos, y el resto son los PCBs no coplanares. Su fórmula empírica es  $C_{12}H_{10}Cl_n$ , donde n puede variar entre 1 y 10, siendo mayoritarios los congéneres con 2 a 7 cloros.

Los PCBs coplanares y los mono-orto sustituidos son los que tienen mayor importancia medioambiental y analítica debido a su mayor toxicidad posiblemente debido a la coplanaridad de la molécula (Headrick et al., 1999; Huwe, 2002; Schechter et al., 2006), y son los que denominamos "compuestos análogos a las dioxinas" (DL-PCBs, de la denominación anglosajona *dioxin-like PCBs*).

Las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos también dependen del grado de cloración y de si son *no-orto*, *mono-orto* o *no coplanares*. Así, la presión de vapor disminuye con el grado de cloración, y lo mismo con su estabilidad en el medio ambiente. El periodo de semivida puede variar desde 10 días a un año y medio; por lo general estos compuestos son termoestables (punto de ebullición de 320-420°C), no los ataca la luz y son difícilmente biodegradables. Son ligeramente solubles en agua y muy liposolubles, por lo que se disuelven en su mayor parte de disolventes orgánicos (Headrick et al., 1999; Huwe, 2002; Schechter et al., 2006).

#### 4.1.2.2. Parámetros toxicocinéticos

Dada la importancia de los efectos tóxicos de estas sustancias, la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de los PCBs han sido estudiadas en profundidad (Van den Berg et al., 1994).

**Absorción:** Debido a la alta liposolubilidad de estos compuestos la absorción es eficaz por todas las vías. No obstante, la principal vía de exposición es la oral, a través de los alimentos, siendo la absorción por el resto de vías prácticamente despreciable. La absorción gastrointestinal puede exceder el 75% de la dosis ingerida para los congéneres tratados con cloro en porcentajes más bajos. El incremento del tamaño molecular (proporcional al número de sustituciones con cloro) reduce significativamente la absorción intestinal, estimándose la absorción de los compuestos con 8 átomos de cloro de tan solo un 2-10%.

**Distribución:** los PCBs se distribuyen extensa y eficazmente por el organismo. Una vez absorbidos alcanzan fácilmente el compartimento central y se distribuyen principalmente unidos a los quilomicrones, lipoproteínas y otras proteínas plasmáticas. El hígado y de forma muy relevante el tejido adiposo son los principales sitios de depósito de estos compuestos en la mayor parte de las especies. En algunas especies son también relevantes como sitios de almacenamiento la piel y las glándulas suprarrenales.

**Metabolismo:** El metabolismo PCBs es necesario para la eliminación urinaria y biliar, desempeñando así un papel importante en la regulación del índice de la excreción de estos compuestos. En ratas, las reacciones metabólicas incluyen la oxidación, preferiblemente en las posiciones laterales y la dechloración reductora así como la rotura de las uniones de oxígeno del difenil-eter.

**Excreción:** La eliminación de los metabolitos polares de PCBs ocurre predominantemente por vía biliar y fecal, donde la excreción urinaria desempeña un papel muy minoritario. Sin embargo, se ha comprobado que esto no es así para todas las especies, ya que por ejemplo la eliminación urinaria desempeña un papel importante en el hámster. La semivida de estas sustancias químicas en humanos es de alrededor de 6 meses, dependiendo del índice de cloración de la sustancia (Leung et al., 2006).

#### 4.1.2.3. Mecanismo de acción y toxicidad

El mecanismo de acción mejor conocido y estudiado de los PCBs es el que está mediado principalmente por su capacidad de unirse al receptor de aril hidrocarburos (AhR), del que son agonistas, induciendo la síntesis de proteínas.

El AhR es un factor de transcripción activado por unión de ligando que está implicado en la regulación de varios genes, incluyendo muchos que codifican para enzimas que desempeñan un papel importante en el metabolismo de las sustancias tóxicas, así como en genes implicados en la regulación del crecimiento



y la diferenciación celular (Denison and Nagy, 2003; Denison et al., 2002; Hahn, 2002; Mandal, 2005). Parece ser que muchos de los efectos tóxicos atribuidos a estos organoclorados requieren la activación del AhR. La toxicidad de congéneres individuales se relaciona altamente con la afinidad con la que estos compuestos se unen al AhR, siendo más tóxicos los congéneres que se unen con mayor afinidad al AhR (Okey et al., 1994).

En ausencia de ligando, el AhR está como complejo soluble multiproteínico en el citoplasma celular. Cuando una dioxina o compuesto análogo (PCBs) atraviesa la membrana plasmática se une al AhR y el complejo ligando-AhR experimenta un cambio conformacional que expone una secuencia de localización nuclear. El complejo se trasloca entonces al núcleo de la célula y las chaperonas se disocian del complejo. El complejo AhR-ligando es capaz ahora de unir varias proteínas nucleares y formar heterodímeros que son capaces de unirse a determinadas regiones del ADN, conocidas como elementos de respuesta a las dioxinas (DRE). La unión de los heterodímeros activados por ligando al DRE estimula la transcripción de una serie de genes. Entre los mejor conocidos están los que codifican para las enzimas de la subfamilia CYP1A1 del citocromo P450 (Denison and Nagy, 2003; Denison et al., 2002). Se piensa, que la modulación continua e inadecuada de la expresión de estos genes es la responsable de una serie de cambios bioquímicos, celulares y de los tejidos que dan lugar a parte de los efectos tóxicos de estos compuestos (Mandal, 2005).

Los PCBs coplanares y los *mono-orto* sustituidos presentan la capacidad de adoptar una conformación coplanar siendo así similares a la del 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-*p*-dioxina, el compuesto más tóxico para los organismos confirmado por numerosos datos (Kannan et al., 1993; Safe, 1990; Seegal et al., 1991; Tanabe et al., 1987). Esta configuración plana facilita que las dioxinas presenten una fuerte afinidad al AhR, lo que ha originado que dichos congéneres de PCBs sean caracterizados como dioxinas por tener un potencial tóxico similar a éstas. Si bien, de los 209 congéneres posibles de PCBs, sólo 12 (DL-PCBs) se considera que tienen efectos análogos a las dioxinas.

Así, los congéneres planos similares a las dioxinas se definen por ser compuestos con un valor de factor de equivalencia tóxica (TEF) distinto al cero, según el proceso de cálculo de equivalencia tóxica establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) en 1989. Los síntomas tóxicos característicos de estos compuestos coinciden con los anteriormente descritos para las dioxinas como agentes inductores de la actividad enzimática del Ah e incluyen pérdida de peso, atrofia del timo, edema subcutáneo, supresión inmunológica, alteración hormonal, carcinogenicidad, y efectos reproductivos de fetotoxicidad y teratogénesis (Tillet et al., 1991). El congénere 118, catalogado como similar a las dioxinas, destaca por su elevado potencial inductor de enzimas y un elevado potencial de toxicidad (McFarland and Clarke, 1989).

En un estudio sobre la comparación de la toxicidad entre los congéneres de PCBs, se inyectaron congéneres en huevos de pollos con un estadio temprano de desarrollo (cuatro días de incubación), resultando que el congener 126 fue el más tóxico y el más potente inductor de la MFO en el hígado de los embriones de pollos (Brunstom and Orberg, 1982).

Otros congéneres de PCBs frecuentemente detectados, como los 138, 153, y 180 tienen una menor toxicidad que los categorizados como similares a las dioxinas (Safe, 1990). McFarland y Clarke (1989), sin embargo, consideran estos mismos congéneres como entre los 36 congéneres más importantes para el medio ambiente, por su prevalente potencial tóxico y la relativa abundancia de éstos en el tejido animal. Los mismos autores categorizaron los congéneres 118 y 138 como los principales causantes de efectos biológicos adversos basándose en su capacidad para inducir el sistema MFO.

### **4.1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos**

72

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs por sus siglas en inglés) son un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Los PAHs, son parte de una clase más amplia de contaminantes conocidos como COPs, sustancias orgánicas que son resistentes a la degradación de los procesos naturales del medio ambiente, o que se dividen o transforman en otras sustancias a través de la luz (fotólisis) o a través de sustancias químicas o biológicas.

Aunque una parte de los PAHs presentes en el medio terrestre y marino tienen su origen en procesos naturales, la fuente de emisión principal es el resultado de numerosas actividades humanas, las cuales han contribuido al incremento general de las concentraciones en los últimos 100 años (Fernández et al., 2000). Estos contaminantes también han adquirido una notable importancia debido a su persistencia en el medio y a que muchos de ellos son potentes tóxicos, mutágenos y teratógenos para los organismos acuáticos e incluso para el hombre (IARC 1987), lo que los llevó a ser considerados contaminantes prioritarios por la USEPA y la Unión Europea (Directiva 2000/60/EC). La USEPA incluye en su lista de contaminantes prioritarios a un grupo de 16 de estos compuestos debido a su mayor toxicidad y prevalencia en el medio ambiente. Además, este grupo de compuestos presentan habitualmente una concentración elevada en zonas sometidas a mayor presión humana por lo que son unos excelentes marcadores de contaminación.

Cerca de 43,000 toneladas métricas de PAHs son descargadas a la atmósfera cada año, y otras 230,000 toneladas en ambientes acuáticos. Aunque los PAHs son ubicuos en la naturaleza como una consecuencia de procesos de biosíntesis por parte de la vegetación terrestre o microbiana, además de la actividad volcánica, las cantidades formadas por estos procesos naturales son pequeñas en comparación

con los producidos a partir de incendios de bosques y fuentes antropogénicas. Son actividades antropogénicas asociadas con una producción importante de PAHs las emisiones de los motores de combustión interna utilizados en el transporte, la industria del hierro y acero, plantas de producción de aluminio, plantas de generación de energía, incineradoras de residuos industriales y municipales, combustión doméstica, industria del petróleo y fabricación de carbón.

#### 4.1.3.1. Clasificación y propiedades físico-químicas

Los PAHs son un grupo de compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno que se configuran en estructuras aromáticas con dos o más anillos fusionados y que pueden existir en varias disposiciones isoméricas. Los PAHs son degradables fotoquímica y biológicamente. Las vidas medias de los diferentes componentes varían considerablemente, de semanas a años, dependiendo de las circunstancias, los organismos y el medio que los rodee.

Los PAHs son poco solubles en agua y se adsorben fuertemente a las partículas, aunque los compuestos de bajo peso molecular (con 3 o menos anillos) son más solubles que los de alto peso molecular (4 o más anillos). Los compuestos de menor peso molecular también se adsorben más débilmente a las partículas que los de alto peso molecular. Por lo tanto, los PAHs unidos a partículas son menos degradables que los volátiles o los solubles en agua. Debido a la baja tasa de degradación, la menor volatilidad y la fuerte adsorción a partículas, los que poseen un elevado peso molecular tienden a acumularse en los sedimentos. El compuesto más estudiado y relevante es el benzo [a] pireno que tiene una estructura con cinco anillos aromáticos condensados.

Los PAHs llegan al medio ambiente marino por vía atmosférica y acuática. Cuando estos compuestos son emitidos al aire, algunos están en fase gaseosa, otros adsorbidos a partículas, mientras que los semivolátiles están, en parte en forma gaseosa, y en parte adsorbidos a partículas, dependiendo de la temperatura y la concentración de éstas. Posteriormente se transfieren desde la atmósfera al suelo o al agua superficial tanto por deposición seca como por sedimentación de las partículas y, dependiendo de la temperatura, se puede producir reemisión desde el suelo. Los compuestos de más bajo peso molecular pueden sufrir una amplia dispersión atmosférica. El transporte atmosférico puede llevar cantidades significativas de esos compuestos a lugares remotos, por lo que pueden encontrarse en sedimentos de lagos a grandes altitudes, sedimentos marinos y nieve y/o hielo del ártico.

Además, su naturaleza lipofílica los hace disponibles para la ingesta y acumulación en los seres vivos. Sin embargo, a diferencia de los COPs descritos anteriormente, los PAHs son **transformados por el metabolismo** de los organismos y por lo tanto no se acumulan en las redes tróficas, es decir, **no se biomagnifican**. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al grado de metabolización y los diferentes

organismos y por lo tanto la bioacumulación de éstos será diferente en función de los diferentes organismos. La biodisponibilidad, es decir, la susceptibilidad de un compuesto para ser incorporado por un organismo, y la fisiología del organismo son las principales variables que determinan el grado de acumulación y retención de estos contaminantes en animales marinos.

Aunque la biodisponibilidad de los PAHs varía de acuerdo a su origen (Murray et al., 1991), los PAHs más biodisponibles son los que se encuentran disueltos en agua. Se ha observado que los hidrocarburos del petróleo son más fácilmente acumulables por los organismos que los que se generan por combustión de materia orgánica (McGroddy and Farrington, 1995). Los PAHs "petrogénicos" se introducen directamente en el ambiente marino en forma disuelta, coloidal o asociados a partículas en suspensión, mientras que los "pirolíticos" están fuertemente asociados a partículas de fuentes pirolíticas (Benlahcen et al., 1997).

#### 4.1.3.2. Parámetros toxicocinéticos

74

Entre los factores fisiológicos que influyen en la cantidad de PAHs en un organismo se encuentran el contenido lípidico, las tasas de ingesta y eliminación (difusión, metabolismo y excreción).

**Absorción:** Los PAHs se absorben por las vías respiratorias, el aparato digestivo y la piel. Su naturaleza lipofílica los hace disponibles para la ingesta y acumulación en los organismos, siendo de esta manera, los alimentos la vía principal de entrada en organismos marinos. La acumulación de contaminantes, ocurre cuando la tasa de ingesta es mayor que la tasa de eliminación. La tasa de ingesta está gobernada externamente por la biodisponibilidad de los PAHs del ambiente circundante, la cual está relacionada con la hidrofobicidad de los compuestos.

Por otro lado, la ingesta está influenciada internamente por factores biológicos, como tamaño del organismo, tasa de respiración, tasa de crecimiento, muchos de ellos intrínsecos a las especies, interdependientes entre sí y a menudo influenciados por factores ambientales como pH, temperatura, O<sub>2</sub> y salinidad.

**Metabolización:** la mayoría de los organismos son capaces de metabolizar determinados PAHs mediante reacciones enzimáticas que transforman los compuestos hidrofóbicos en metabolitos más polares y solubles que pueden ser excretados más fácilmente por medios activos o pasivos. El sistema MFOs cuando es inducido por la exposición a PAHs aumenta la actividad en el hígado y otros tejidos.

**Excreción:** La eliminación puede producirse por difusión cuando la concentración en el exterior es menor que la concentración presente en el tejido. Esta eliminación pasiva puede ser rápida para PAHs de bajo peso molecular pero muy lenta para PAHs con alto peso molecular y bajas solubilidades (Meador et al., 1995). El efecto de la metabolización, es el aumento de la tasa de eliminación que también puede verse influenciada por factores ambientales como temperatura y salinidad, factores fisiológicos como estado reproductivo, edad, sexo así como la ruta de ingestión o la hidrofobicidad. Los metabolitos y sus conjugados se excretan por la orina y las heces.

#### 4.1.3.3. Mecanismo de acción y toxicidad

El mecanismo de acción de los PAHs, al igual que algunos organoclorados anteriormente citados, tiene una elevada afinidad por el receptor Ah. El sistema MFOs está constituido por monooxigenasas ligadas al citocromo P450, término que se atribuye a una cadena de transporte de electrones que tiene por aceptor final al citocromo P450.

75

Aunque la toxicidad aguda de muchos PAHs en animales de experimentación suele ser baja, los niveles de estos compuestos son habitualmente objeto de estudio en el medio ambiente marino por sus efectos tóxicos a medio y largo plazo. Como consecuencia de sus diferentes propiedades físico-químicas, en concreto su solubilidad, el comportamiento en el ambiente acuático de los PAHs de bajo y alto peso molecular es muy diferente (Law and Klungsoyr, 2000). Los PAHs de bajo peso molecular son, en general, moderadamente tóxicos. Por otro lado, muchos PAHs de elevado peso molecular son mutagénicos y teratogénicos (Meador et al., 1995) y además los metabolitos de estos PAHs son potenciales carcinógenos para los animales y humanos, siendo el benzo [a] pireno uno de los principales exponentes.

Así, la exposición a los PAHs está asociada con diferentes efectos que incluyen toxicidad cardiovascular, en la reproducción (Carls et al., 1999), en la médula ósea, supresión del sistema inmune (Dunier and Siwicki, 1993) o toxicidad en el hígado. No obstante el efecto tóxico más importante resultado de la exposición a los PAHs es el cáncer (Collins et al., 1998). En la actualidad, la idea central de lo que se cree es el mecanismo de inducción del cáncer por productos químicos es que los compuestos cancerígenos son, o se convierten metabólicamente, en reactivos electrofílicos que ejercen sus efectos biológicos por interacción covalente con macromoléculas celulares, tales como ADN, ARN o proteínas.

También hay que tener en cuenta que algunos de los PAHs, además de la toxicidad directa, muestran un aumento de la toxicidad tras exposición a la luz

ultravioleta, especialmente hidrocarburos aromáticos de elevado peso molecular (Ankley et al., 1994). La fototoxicidad en el medio marino puede ser importante cuando grandes cantidades de PAHs se han liberado después de un vertido de petróleo, especialmente si el producto vertido es un fuel pesado con una mayor concentración de PAHs fototóxicos (Pelletier et al., 1997).

## 4.2. Contaminantes inorgánicos persistentes (CIPs)

Los metales y metaloides son contaminantes ubicuos que han acompañado al hombre desde la más remota antigüedad. Así, los envenenamientos por arsénico, plomo y mercurio poseen un carácter legendario. La intoxicación crónica por plomo ocasionada por la presencia de este metal en las bebidas pudo ser causa del debilitamiento y caída del imperio romano. El uso del arsénico como veneno, tan socorrido en las novelas policíacas, encuentra su base real en numerosos incidentes históricos, como la preparación de cosméticos y pócimas por la célebre Toffana, envenenadora siciliana del siglo XVII. La exposición profesional al mercurio es la base de expresiones como *temblar como un azogado* (intoxicado por mercurio), en referencia a los efectos tóxicos sobre el sistema nervioso central que experimentan las personas expuestas durante periodos prolongados a los vapores de este metal.

A diferencia de otros contaminantes ambientales, los metales son elementos químicos que el hombre no crea ni destruye. El papel que el hombre desempeña en la presencia ambiental de metales es, por una parte, introducir en el medio ambiente estos elementos como consecuencia de las distintas actividades humanas y, por otra, alterar la forma química o bioquímica en que se encuentran. Los metales están sujetos de forma natural a ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los compartimentos ambientales: suelos, aguas subterráneas y superficiales, aire y seres vivos. La intervención humana puede modificar considerablemente la concentración de metales en estos compartimentos y facilitar su distribución a partir de las reservas minerales en las que los metales se encuentran naturalmente confinados.

Desde el punto de vista toxicológico, los metales suelen presentar una acusada multiplicidad de efectos tóxicos. La especie química concreta del metal influye poderosamente en sus efectos tóxicos, así como en las variables toxicocinéticas de absorción, distribución y excreción. La trascendencia toxicológica de los metales es enorme, teniendo en cuenta su ubicuidad, la extensión de sus usos industriales y domésticos y su persistencia medioambiental, resultado directo de su condición de elementos químicos. Estas características son las que hacen que varios de ellos se consideren conjuntamente con los COPs cuando hablamos de Contaminantes Tóxicos Persistentes.

El océano suele ser el destino final de los CIPs. Sin embargo, debido a la dilución masiva de los contaminantes en el mar, es difícil determinar el efecto de esta contaminación sobre los organismos marinos. En los estuarios ocurre lo contrario, y muchos de ellos están contaminados en todo el mundo, no ya por la contaminación actual, sino por la ocurrida muchos años atrás por la actividad industrial y minera (Bryan and Langston, 1992; Grant and Middleton, 1990). Cuando el agua contaminada de los ríos llega al mar, los sedimentos se depositan en el fondo, acumulándose los CIPs. Incluso si la contaminación de los ríos cesa, los estuarios en los que desembocan continuarán afectados durante años debido a la continua remoción de los sedimentos contaminados.

La extensión de la contribución humana a los ciclos globales de los metales se puede denominar factor de enriquecimiento antropogénico (AEF) (**Tabla 2**).

**Tabla 2.**

Metal	Fuentes antropogénicas (A)	Fuentes naturales	Total (T)	AEF = A/T x 100
<b>Cadmio (Cd)</b>	8	1	9	89%
<b>Plomo (Pb)</b>	300	10	310	97%
<b>Zinc (Zn)</b>	130	50	180	72%
<b>Mercurio (Hg)</b>	100	50	150	66%

*Todos los datos en 10<sup>6</sup> kg/año (Walker et al., 1996).*

De la tabla 2 se concluye que la actividad humana es la responsable de gran parte del movimiento de los metales representados (Cd, Pb, Zn y Hg) en el medio ambiente.

Existe una clasificación de los metales según su importancia como contaminantes: Clase A (afines al oxígeno), Clase B (afines al nitrógeno y azufre) e intermedios (Nieboer and Richardson, 1980) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.**

Clase A	Intermedios	Clase B
Calcio	Zinc	Cadmio
Magnesio	Plomo	Cobre
Manganeso	Hierro	Mercurio
Potasio	Cobalto	Plata
Estroncio	Níquel	
Sodio	Arsénico	
	Vanadio	

Esta clasificación es importante en relación al conocimiento de la tasa de transporte de estos iones a través de las membranas celulares, y sitios de almacenamiento (en proteínas o en gránulos citoplasmáticos). La clase B y la intermedia son de especial importancia, ya que su afinidad por compuestos con nitrógeno o azufre contribuyen a su capacidad de formar complejos proteicos (Roesijadi and Robinson, 1994).

#### **4.2.1. Toxicocinética, mecanismo de acción y toxicidad de los CIPs**

Los metales no son biodegradables. La absorción de los metales varía en función de la vía de entrada en el organismo, de su especiación química y de mecanismos homeostáticos. La distribución de los elementos metálicos en el organismo depende de la facilidad con que atraviesan las membranas y de la afinidad por los componentes de órganos y tejidos (Soria et al., 1995).

78

La mayoría de los elementos se transportan unidos a la fracción macromolecular de las proteínas plasmáticas, mediante enlace con grupos funcionales, en especial sulfhidrilos, amino, fosfatos, carboxilato, imidazol e hidróxido; de ellos los más estables son las uniones con el azufre y el nitrógeno de los grupos sulfhidrilo y amino (Goyer, 1996).

La detoxificación por parte de los organismos consiste en secuestrar iones metálicos activos con proteínas como la metalotioneína o el glutatión, o depositándolos en una forma insoluble en gránulos intracelulares, o su excreción por heces. Se han descrito complejos de metaloproteínas involucrados en la detoxificación o protección de la toxicidad de algunos metales (Goyer, 1984). Las metalotioneínas forman complejos con el Cd, Zn, Hg, cobre (Cu), y otros metales (Roesijadi and Robinson, 1994), y la ferritina y la hemosiderina son ferropoteínas intracelulares que acumulan hierro.

En ocasiones, la biotransformación puede modificar el estado de oxidación del ion metálico, con aumento de su toxicidad, como ocurre por ejemplo con el arsénico ( $\text{As}^{3+}$  resulta más tóxico que  $\text{As}^{5+}$ ) (Soria et al., 1995).

La especiación química del metal es un factor importante en su posible papel toxicológico, no sólo en su absorción, sino también en la acción que llevará a cabo dentro del organismo. Por ejemplo, el fosfato forma sales menos solubles con metales y con otros iones, mientras que los compuestos alquilo, como el tetraetilplomo o el metilmercurio son liposolubles, siendo más solubles en la mielina que las sales inorgánicas de dichos metales (Goyer, 1996) lo que redundará en una mayor neurotoxicidad.



Los metales se pueden encontrar como iones libres o en compuestos inorgánicos, lo cual afecta a su biodisponibilidad. Los compuestos metálicos orgánicos e inorgánicos insolubles precipitan, e imposibilitan su bioconcentración (Hodson, 1988). Sin embargo, la formación de ciertos compuestos organometálicos aumenta su hidrofobicidad, lo cual favorece su bioconcentración (Tsuda et al., 1988).

Los efectos tóxicos de los CIPs varían enormemente entre elementos, considerándose aquellos más tóxicos los metales no esenciales para los animales o seres humanos. Entre los efectos crónicos producidos por estos contaminantes se incluye el cáncer, efectos sobre el sistema inmunológico y el aparato reproductor. Nos interesa sobre todo destacar, que la capacidad de ejercer efectos sobre la acción hormonal de algunos de los CIPs (como el Cd, Hg, As, Pb ) se produce incluso a dosis muy bajas, compatibles con las dosis de exposición medioambiental a este metal (Lavivoli et al., 2009). Los efectos sobre el sistema endocrino (alteración o disrupción endocrina) de los CIPs se analizarán a continuación en conjunción con los COPs.

### 4.3. Los contaminantes químicos como disruptores endocrinos

Es necesario distinguir claramente entre los efectos tóxicos agudos de los CTPs, producidos tras la exposición habitualmente única a dosis elevadas, de los efectos crónicos de una exposición a dosis muy bajas pero durante periodos de tiempo muy largos, que pueden abarcar toda la vida. Gran parte de los efectos adversos que tiene la exposición crónica a dosis bajas de estas sustancias químicas en los seres vivos, en el contexto de la exposición ambiental, han sido encuadrados en el fenómeno denominado disrupción endocrina. Por lo tanto los contaminantes químicos capaces de producir disrupción endocrina son denominados **DISRUPTORES ENDOCRINOS**.

Según la USEPA, un disruptor endocrino (DE) es *“un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión o eliminación de las hormonas que de forma natural están presentes en el cuerpo y que son las responsables de la homeostasis, la reproducción y el desarrollo”* (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

El rango de compuestos químicos que se consideran disruptores endocrinos es muy amplio y crece día a día, comprendiendo desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos o en el medioambiente.

La capacidad de los contaminantes químicos medioambientales para interferir en la función endocrina fue establecida hace más de 30 años. El hecho inicial fue la constatación de que la población de pájaros piscívoros había declinado en los Estados Unidos debido a problemas reproductivos graves. Tales observaciones permitieron la identificación del 4,4'-DDE, un metabolito del pesticida organoclorado DDT, como agente causante de las alteraciones reproductivas observadas (Hickey and Anderson, 1968). El problema fue parcialmente resuelto con la retirada del pesticida en 1972, aunque como hemos visto sus residuos continúan estando presentes en el medioambiente, afectando por tanto a las poblaciones expuestas.

Actualmente el conocimiento acerca de estas sustancias y sus mecanismos de acción es bastante grande, pero quedan aún grandes lagunas en la comprensión global de sus efectos sobre la salud del hombre y el resto de los seres vivos. En un principio se pensaba que los DE ejercían sus efectos principalmente a través de su unión con los receptores nucleares para hormonas, incluyendo los receptores de estrógenos (REs), los receptores de andrógenos (RAs), los receptores de progesterona (RPs), los receptores de hormonas tiroideas (RTs) y los receptores de retinoides, entre otros. Hoy en día la base científica de conocimiento sobre el tema ha aumentado y muestra que el espectro de mecanismos de acción es mucho mayor. Así se sabe que los DE actúan mediante su unión a los receptores nucleares, pero también a los receptores no nucleares (o de membrana) para hormonas esteroideas, receptores no esteroideos (p.e. receptores para neurotransmisores, como el receptor de serotonina, el receptor de dopamina o el receptor de norepinefrina), receptores huérfanos (p.e. el AhR), rutas enzimáticas implicadas en la biosíntesis de esteroides y/o metabolismo, y numerosos otros mecanismos que convergen en la afectación de los sistemas endocrino o reproductivo. De esta manera, desde una perspectiva fisiológica, un DE es un compuesto, ya sea natural o sintético, que, a través de la exposición ambiental, altera los sistemas hormonales y homeostáticos que le permiten al organismo comunicarse y responder a su medioambiente (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Si bien la mayor parte de los efectos netos de los DE podrían catalogarse como "efectos estrogénicos", lo cual ha motivado que durante tiempo se haya hablado de los DE como sinónimo de xenoestrógenos, existen numerosas sustancias que tienen efectos androgénicos o, más frecuentemente antiandrogénicos, y también como agonistas o antagonistas de las hormonas tiroideas.

El grupo de moléculas de origen antropogénico que han sido identificadas hasta el momento como DE es enormemente amplio y heterogéneo, e incluye desde sustancias plásticas o plastificantes (como el Bisfenol A), fungicidas (como la vinclozolina), fármacos (como el dietilestilbestrol, DES) y, por supuesto, gran parte de los CTPs incluidos en el Convenio de Estocolmo: PAHs, PCBs, dioxinas y furanos así como muchos de los POCs (DDT, metoxicloro, clordano, entre otros). Incluso algunos metales pesados y metaloides pueden tener actividad estrogénica, por lo que también pueden ser incluidos como DE.

Hay que destacar que no todos los DE son de origen antropogénico, sino que también existen en la naturaleza sustancias que han sido identificadas como DE, como los fitoestrógenos o el cumarol (Kuiper et al., 1998). Es presumible que una vez que se disponga de una batería adecuada de tests toxicológicos, útiles para explorar diferentes actividades hormonales, la lista de nuevos disruptores endocrinos se ampliará sustancialmente. De hecho los organismos nacionales e internacionales con intereses en la regulación y comercialización de compuestos químicos han lanzado la propuesta para la estandarización de estos tests y su aplicación sistemática a los compuestos de nueva creación y a aquellos preexistentes. Es esta una tarea difícil y costosa si se tiene en cuenta que está previsto testar en los próximos años más de 100.000 moléculas químicas y que los tests deben investigar actividades hormonales/antihormonales muy diversas. La lista de mimetizadores hormonales aumenta con la misma velocidad que se expande nuestro conocimiento sobre las formas de exposición a estas sustancias. Esto se debe de una parte al descubrimiento (muchas veces accidental) de la contaminación de muestras biológicas de origen animal y humano, y de otra, a la información disponible sobre utilización, uso y consumo de estos compuestos químicos.

Todas estas sustancias son, lógicamente, muy diversas desde un punto de vista químico, lo que representa un desafío en el campo de estudio de la disrupción endocrina, ya que, aparte de su pequeño tamaño (< 1000 Daltons), no parecen compartir otras características que hagan predecir si una molécula química va a comportarse como un DE o no. Sin embargo, en términos muy amplios, DE como los PCBs y POCs por ejemplo contienen grupos halogenados en su estructura (con sustituciones por átomos de cloro). Además, muchas de estas moléculas contienen un grupo fenólico que se piensa que es el responsable de conferirles similitud con las hormonas esteroideas, siendo así reconocidos como ligandos por los receptores de dichas hormonas, ya sea como agonistas o como antagonistas.

Ya hemos visto que las fuentes de contaminación y de exposición a estos compuestos que se comportan como DE son muy variables, pero pueden considerarse un fenómeno global que afecta a todos los seres vivos del planeta, que están expuestos de forma constante a mezclas, enormemente variables de individuo a individuo y de región en región, de estas sustancias que fueron mayoritariamente diseñadas para ser persistentes. La situación es además cambiante, puesto que como ya sabemos, muchos de estos compuestos han sido prohibidos hace ya décadas, mientras que otros aún están permitidos para algunos usos o han sido prohibidos mucho más recientemente.

## 5. Contaminantes tóxicos persistentes en fauna salvaje

### 5.1. Breve descripción general

El descubrimiento de que los POCs podrían reducir el espesor de la cáscara de huevo en las especies de rapaces, es quizás el caso más conocido y ampliamente documentado en toxicología de fauna salvaje. Durante los años 1940 y 1950, Derrick Ratcliff de la British Nature Conservancy señaló un descenso en las poblaciones de halcón peregrino (*Falco peregrinus*) en toda Europa. Poco después, el fracaso reproductivo en estos halcones y en otras especies de aves se asociaron a una disminución del grosor de la cáscara del huevo (Ratcliffe, 1967). La novela de Rachel Carson (1962), que ya hemos nombrado anteriormente, alimentó el debate entre los graves efectos de la contaminación ambiental y la vida silvestre. Ratter y col. (2009) hacen una amplia revisión de la historia de la toxicología en la fauna salvaje, describiendo intoxicaciones por plomo en faisanes (*Phasianus colchicus*) ya en el año 1876 (Calvert, 1987).

En 1979, debido a la creciente necesidad de investigar en aspectos relacionados con la contaminación ambiental, se creó "The Society of Environmental Toxicology and Chemistry" (SETAC). Toxicólogos en fauna silvestre fueron los primeros miembros de esta sociedad, y hoy en día, sigue siendo una importante organización para la difusión de trabajos de investigación en este campo (Kendall, 2008). El descubrimiento de masivas mortalidades de animales en el campo asociadas a las sustancias químicas, llevó a los toxicólogos de la época a iniciar experimentos en el laboratorio con el objetivo de establecer datos de referencia sobre la toxicidad aguda y crónica de los contaminantes ambientales en fauna salvaje.

Actualmente, la toxicidad de muchos de los contaminantes ambientales bien conocidos, como el DDT, los PCB, y varios metales, han sido ampliamente estudiados en la fauna salvaje. Aunque todavía queda mucho por aprender acerca de los efectos de estas sustancias por sí solas, y especialmente en las mezclas, durante aproximadamente los últimos 30 años se ha hecho un enorme progreso. Además, los límites de protección para los seres humanos en las actuales evaluaciones de riesgo de las sustancias químicas a menudo se basan en los datos de exposición de fauna silvestre. Por lo tanto, los estudios toxicológicos en fauna silvestre ofrecen la oportunidad de participar en procesos de regulación dirigidas a la protección de la salud ambiental y humana.

La contaminación de los ambientes acuáticos, y en particular de nuestros océanos, ha planteado muchas preguntas acerca de la condición de nuestro medio ambiente. Así, en la actualidad disponemos de una amplia revisión bibliográfica

de monitorización de concentraciones de contaminantes tóxicos persistentes en muchas especies animales terrestres y marinos (Di Giulio and Hinton, 2008; Gardner, 2006b; Kendall, 2010; O'Shea and Tanabe, 2003; Rattner et al., 2011; Sparling et al., 2010). Nosotros centraremos nuestra revisión principalmente en animales de vida acuática, y más concretamente en tortugas marinas.

## 5.2. CTPs en animales de vida acuática

Las concentraciones de CTPs se han analizado en muchas especies marinas como peces y crustáceos por su posible efecto en el ser humano al ingerirlos como alimento. Sin embargo, los mamíferos marinos son por excelencia, las especies animales de vida silvestre que han sido estudiadas en mayor profundidad (O'Shea and Tanabe, 2003). Su posición en lo más alto de la cadena trófica, y el carácter de biomagnificación que acompaña a este grupo de contaminantes, hacen que se conviertan en las especies de vida acuática que mayores concentraciones de contaminantes acumulan. Además, el tejido adiposo de estos mamíferos marinos representa un porcentaje destacable dentro de su composición corporal, siendo un depósito ideal para estos contaminantes lipofílicos (Cockcroft et al., 1989). Esto unido al hecho de que son animales con un largo periodo de vida justifica que lleguen a almacenar elevadas concentraciones de compuestos tóxicos.

Por el contrario, las tortugas marinas se encuentran en eslabones más bajos de la cadena trófica, detectándose así concentraciones de contaminantes persistentes más bajas en los tejidos de estos reptiles que en tejidos de otras especies (de reptiles en general, ver: Sparling et al., 2010; tortugas en general, ver: Meyers-Schone and Walton, 1994; lagartos y serpientes, ver: Campbell and Campbell, 2002; mamíferos, ver: Aguilar et al., 2002). En un reciente estudio llevado a cabo por Lazar y col. (2011) en tortuga boba (*Caretta caretta*), observaron que el factor de biomagnificación de compuestos organoclorados fue de un orden de magnitud varias veces más bajo que el observado en mamíferos marinos en estudios previos (Fraser et al., 2002; Strandberg et al., 1998; Weijs et al., 2009). Además de las diferencias del estado trófico, la disminución de factores de biomagnificación quizás también puede ser debido al resultado de una más baja actividad metabólica y diferencias en la capacidad de eliminación de contaminantes persistentes entre mamíferos y tortugas marinas (Gray, 2002; McKay and Fraser, 2000).

La bioconcentración (y por lo tanto la biomagnificación) de otros contaminantes como los metales varía en gran medida no solo en función de la especie del organismo expuesto, sino además del metal en cuestión (Bradley and Sprague, 1985). Algunas especies acumulan altas concentraciones de metales (p. e., zooplancton), mientras que otros organismos superiores (p. e., peces) tienen sistemas que regulan la concentración o presentan proteínas (metalotioneínas) que secuestran los metales (Hodson, 1988; Rainbow and White, 1990).

Como ya mencionamos, los PAHs a diferencia de otros CTPs, sí pueden ser metabolizados por algunos organismos. Así por ejemplo, los organismos acuáticos que metabolizan poco los PAHs como las algas y los moluscos y otros invertebrados, pueden acumular altas concentraciones de PAHs, mientras que organismos que los metabolizan como los peces y otros vertebrados los acumulan poco. Las concentraciones de PAHs observadas en organismos marinos indican un alto grado de contaminación en algunas áreas. Un estudio llevado a cabo recientemente sobre bivalvos (*Perna perna*) en 18 estaciones a lo largo de la costa atlántica de Marruecos dio valores para ( $\Sigma 14$  PAHs) de 3.4 a 34.6 ng/g peso fresco con valores de 87-109 ng/g peso fresco cerca de ciudades como Agadir o El Jadida (Moukrim, 2002).

Aunque no existe una amplia bibliografía como en el caso de los mamíferos marinos, en las últimas décadas se ha hecho un gran avance en el número de estudios de la mayoría de los CTPs en diferentes tejidos de tortugas marinas (ver revisiones de Meyers-Shone and Walton, 1994; Pugh and Becker, 2001; D'lio et al., 2011). Los COPs más ampliamente documentados son los contaminantes organoclorados en tortugas marinas (Corsolini et al., 2000; Gardner et al., 2003; Labrada-Martagón et al., 2011; Lake et al., 1994; Lazar et al., 2011; Miao et al., 2001; Monagas et al., 2008). Los metales pesados y metaloides también han sido ampliamente documentados (Aguirre et al., 1994; Franzellitti et al., 2004; García-Fernández et al., 2009; Gardner et al., 2006; Godley et al., 1999; Godley et al., 1998b; Gordon et al., 1998; Maffucci et al., 2005; Sakai et al., 2000; Storelli et al., 1998b; Storelli and Marcotrigiano, 2003; Storelli et al., 2005; Torrent et al., 2004). Sin embargo, otros CTPs como los PAHs han sido poco estudiados en estos reptiles (Alam and Brim, 2000; Camacho et al., 2012; Godley et al., 1998a). De esta manera, si bien disponemos de estudios en diferentes tejidos o huevos de todas las especies de tortugas marinas, es cierto que mientras algunas poblaciones han sido ampliamente estudiadas, de otras carecemos de información de exposición a contaminantes. Las regiones más estudiadas son la costa este de EE.UU. y el mar Mediterráneo. Las diferencias de concentración de contaminantes observadas entre diferentes zonas reflejan las diferentes grados de exposición de las tortugas marinas según sus movimientos migratorios o áreas de alimentación (Alava et al., 2011; Ragland et al., 2011), estando mayormente expuestas tortugas marinas que se alimentan en zonas costeras de mayor contaminación (Komoroske et al., 2012).

El perfil de distribución de los contaminantes en los diferentes tejidos varía enormemente en vertebrados marinos, encontrándose las mayores concentraciones de organoclorados por ejemplo, en el tejido adiposo, seguida por el hígado, riñones y músculo (Colborn and Clement, 1992; Martineau et al., 1987; McKenzie et al., 1999; Rybitski et al., 1995; Tanabe et al., 1983). Esto es atribuible a la cantidad del contenido lipídico y triglicéridos de los tejidos y la afinidad de estos contaminantes para acumularse en la grasa, existiendo una fuerte correlación entre la cantidad de lípidos y la concentración de estos contaminantes (Cockcroft et al., 1989).

La mayor parte de los datos de contaminantes en tortugas marinas provienen de tortugas muertas, tortugas con hipotermia, animales varados o tortugas capturadas accidentalmente durante actividades de pesca (Innis et al., 2008; Pugh and Becker, 2001). Los niveles de concentración de contaminantes en animales muertos quizás estén sesgados debido al hecho de que los animales muertos puedan presentar mayores concentraciones que animales vivos. Aguilar y col. (1994a) observaron cómo delfines muertos por la epidemia de morbillivirus presentaron concentraciones mucho mayores que animales aparentemente sanos de la misma zona. En tortugas marinas algunos autores han observado igualmente mayores concentraciones en animales muertos por enfermedad que en aquellos vivos aparentemente sanos (Keller et al., 2004a).

Además, la descomposición de cadáveres varados puede complicar el análisis de contaminantes. Un estudio reciente ha demostrado la utilidad de la sangre como un tejido alternativo para el análisis de organoclorados en tortugas marinas (Keller et al., 2004a; Keller et al., 2004b). La fuerte correlación observada entre la concentración de CTPs en sangre y los diferentes tejidos indican que los contaminantes en la sangre están en equilibrio con su almacenamiento en los tejidos, siendo así un buen estimador de la concentración de éstos en el tejido adiposo, hígado, músculo y riñones (Keller et al., 2004a; van de Merwe et al., 2010). Prueba de la utilidad de la sangre para analizar las concentraciones de estos contaminantes en tortugas marinas como un método no letal, otros autores han estudiado los CTPs en sangre de tortuga marina (Day et al., 2005; Day et al., 2007; Kenyon et al., 2001; Labrada-Martagón et al., 2011; Ragland et al., 2011; Swarthout et al., 2010; van de Merwe et al., 2010).

Sin embargo, existen algunos factores biológicos que deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados de los CTPs en los seres vivos. La persistencia de los niveles de contaminantes puede variar en función de la dieta, edad, sexo, estado reproductivo, condición corporal o la incidencia de enfermedades. Además, se debe tener en cuenta que, en momentos de cambios fisiológicos como enfermedades, temperaturas extremas, compromiso nutricional, producción de huevos o gestación y lactancia, las reservas lipídicas pueden ser movilizadas para obtener energía, redistribuyendo los CTPs acumulados en las reservas grasas hacia el torrente sanguíneo (Aguilar and Borrell, 1994b; Debier et al., 2006; Humphrey, 1988; Keller et al., 2004a; Lydersen et al., 2002; Matthews et al., 1984). El hecho de que los animales muertos presenten mayores concentraciones que los animales vivos, puede estar influido por algunos de estos factores biológicos, modificando así sustancialmente la interpretación de los resultados obtenidos. Por lo tanto, el buen conocimiento de estos parámetros y del método analítico usado, es fundamental en los trabajos de campo que se realicen.

## 5.3. Factores biológicos que afectan la persistencia de los niveles de contaminantes en el organismo

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

Sin embargo, cuando se estudia un número lo suficientemente amplio de individuos pertenecientes a la misma población, se observa una variación sustancial en los niveles de residuos encontrados en los tejidos. Lo que esto sugiere es que individuos de la misma población, aun expuestos a las mismas condiciones ecológicas, no se exponen de manera idéntica a los contaminantes y que su capacidad de excreción de los mismos es también diferente. Esto indica que comparar resultados sea frecuentemente complicado así como asegurar la extensión de la exposición, debido a las diferencias significativas que aparecen a nivel tisular entre individuos de diferentes sexos, edad, estado reproductivo o condición nutricional (Aguilar et al., 1999).

### 5.3.1. Composición corporal y condición nutritiva

La distribución de contaminantes en un organismo es compleja, pero principalmente depende de las propiedades físicas y químicas de los componentes que lo forman y del organismo en sí. Como hemos visto, una de las características de la mayoría de los CTPs es el carácter lipofílico de estas sustancias. Esta propiedad implica que un organismo con grandes compartimentos de grasa tendrá gran capacidad para retener tales contaminantes químicos (Aguilar, 1985). Además, la composición corporal afecta a la contribución relativa de cada parte del cuerpo a la carga corporal total de contaminantes. Así, un órgano contribuirá de manera más importante a la carga total de contaminantes cuanto mayor sea su contenido en grasa o, como en el caso del músculo, cuanto mayor sea su representación en la masa corporal (Aguilar, 1985).

Por lo tanto, el reparto de los contaminantes lipofílicos será proporcional al contenido de lípidos en los tejidos, por lo que las concentraciones tienden a ser más altas en tejido adiposo, seguido por los huevos, los testículos, el hígado, los riñones y músculo en diferentes especies (Bishop et al., 1995; Bryan et al., 1987; Dabrowska et al., 2006; Perugini et al., 2006; Storelli et al., 2007). La grasa subcutánea contiene la mayor cantidad de contenido lipídico y porcentaje de triglicéridos (expresado sobre el total de lípidos). En contraste, el músculo pectoral presenta el menor contenido de lípidos y triglicéridos y el mayor nivel



de lípidos polares, presentando las concentraciones más bajas de organoclorados entre los tejidos analizados (Rybitski et al., 1995). Aunque las gónadas presentan un mayor porcentaje de lípidos frente al músculo (Lutcavage and Musick, 1985), muchas de los animales que se analizan son aún juveniles y la pequeña cantidad de tejido gonadal con el que se cuenta es insuficiente para realizar los análisis necesarios. Por ello se considera que la grasa subcutánea debe ser el tejido a elegir para la detección de los organoclorados en tortugas marinas muertas (Rybitski et al., 1995). Por otro lado, la distribución de los metales en los tejidos varía en función del metal en cuestión. En general, las mayores concentraciones han sido observadas en el hígado y riñón (García-Fernández et al., 2009; Storelli and Marcotrigiano, 2000; Torrent et al., 2004). Sin embargo, no está claro que el estado nutritivo pueda influenciar la concentración de tejidos de contaminantes no lipofílicos (algunos metales pesados) (Aguilar and Borrell, 1990).

Por otro lado, los niveles de CTPs detectados en sangre son muchísimo más bajos que los esperados en cualquier tejido animal. Sin embargo, los contaminantes en la sangre están en equilibrio con su almacenamiento en los tejidos, considerándose un buen estimador de la concentración de éstos. El hecho de poder analizar los contaminantes a través de un método no letal, es fundamental en estas especies protegidas. La concentración en sangre de muchos contaminantes son más un indicador de exposición reciente, mientras que los escudos de caparazón de tortugas marinas reflejan más la contaminación a largo plazo (Wang, 2005). Con las ventajas de los modernos instrumentos capaces de detectar contaminantes a niveles muy bajos, es posible determinar sustancias xenobióticas en la sangre, cáscara o escudos con una alta precisión, pudiendo así monitorizar los niveles de contaminantes ambientales en las poblaciones naturales.

### 5.3.2. Dieta

La mayoría de las sustancias que actúan como CTPs se incorporan a los seres vivos mediante la ingestión de alimentos. El efecto de la dieta es particularmente importante porque muchas de estas sustancias químicas aumentan su concentración a través de la cadena trófica, siendo la concentración en los grandes predadores mucho mayor que en aquellos organismos que ocupan niveles tróficos más bajos. Por lo que diferencias en el tipo de alimentación conllevarán también a diferencias de las concentraciones en sus tejidos.

Para aquellos contaminantes en los que la biomagnificación es importante, la dieta resulta un factor determinante en la concentración de los tejidos. Así se explican la mayoría de las variaciones interespecíficas que se dan en especies que habitan en las mismas aguas. Sin embargo, independientemente del factor de bioacumulación, algunos organismos pueden mostrar especificidad para la acumulación de un determinado compuesto lo que puede llevar a un aumento de los niveles del mismo en los subsiguientes estados de la cadena trófica. Por ejemplo, los niveles de níquel en ballenas son comparativamente mayores que en odontocetos (Aguilar et al., 1999).

Sin embargo, es importante recordar que la dieta puede variar sustancialmente a niveles intraespecíficos o interespecíficos. Particularmente, la variación en la dieta asociada con la edad y el sexo, sobre todo en especies con dimorfismo sexual, ha sido estudiada para gran número de especies de mamíferos marinos (Bernard and Hohn, 1989; Clarke et al., 1993; Recchia and Read, 1989; Seaman et al., 1982). Los cambios en la dieta pueden, en ocasiones, resultar en variaciones sustanciales en el tipo de organismo consumido o incluso en el nivel trófico explotado. Así por ejemplo, se han observado concentraciones tisulares de Cd superiores en especies consumidoras de calamares por la capacidad de los calamares de mantener altos niveles de este metal (Szefer et al., 1994). Por otro lado, Tanabe y col. (1984) observaron que los rorcuales alibancos del hemisferio sur en edad juvenil presentan niveles de PCBs y DDTs mayores que aquellas en edad adulta.

Por lo general, los animales en los niveles tróficos superiores de los ecosistemas acuáticos tienen el mayor potencial de bioacumulación de contaminantes orgánicos persistentes (Borgå et al., 2004). Los reptiles van desde herbívoros a carnívoros estrictos. Se ha descrito que la posición trófica en los reptiles parece estar relacionada con el tamaño del cuerpo, al menos para aquellas especies que son omnívoros o carnívoros. Tanto para las tortugas de caparazón blando de Florida (*Apalone ferox*) (Aresco and James, 2005) y las tortugas boba (Godley et al., 1998b; Hatase et al., 2002), el tamaño del cuerpo incrementó con la posición trófica. Sin embargo, esto no se ha observado en especies de tortugas herbívoras como algunos galápagos (*Pseudemys floridana*) (Aresco and James, 2005), y la tortuga verde (Godley et al., 1998b). Bergeron y col. (2007) encontraron que las tortugas de agua dulce que tenían una posición más alta en la cadena trófica tenían mayor concentración de Hg y metilmercurio (MeHg).

De esta manera, se ha observado que tortugas de mayor tamaño tiendan a acumular mayores concentraciones de compuestos organoclorados en el hígado (Hebert et al., 1993) y en el plasma sanguíneo (de Solla et al., 1998). Esto también se ha observado en adultos de culebras viperinas (*Natrix maura*) (Santos et al., 1999) y en serpientes semiacuáticas venenosas (*Agkistrodon piscivorus*) (Rainwater et al., 2005). De este modo, las concentraciones mayores observadas en individuos más grandes (y presumiblemente mayores) de especies omnívoras o carnívoras, pueden ser debidas a que la tasa de acumulación excede la tasa de eliminación para la mayoría de los tejidos, una menor tasa metabólica o capacidad para metabolizar y eliminar los contaminantes que individuos de mayor tamaño. Además el hecho de estar en niveles tróficos superiores hace por lo tanto que animales mayores estén sujetos a una mayor exposición que animales más pequeños (Hebert and Weseloh, 2006).

En las especies de tortugas marinas es también común detectar diferentes niveles de CTPs entre las distintas especies. De manera general, los ejemplares de *Caretta caretta* acumulan mayores niveles que los de la especie *Chelonia mydas* y *Dermochelys coriacea* (Godley et al., 1998a; McKenzie et al., 1999). Estas

diferencias pueden estar relacionadas con los hábitos de la dieta de la tortuga boba y su posición más alta en la cadena alimenticia, conduciendo así a una mayor exposición de los contaminantes. Para el caso de la tortugas láud (*Dermochelys coriacea*) hay que destacar dos motivos principales que probablemente actúan conjuntamente en disminuir la posible exposición a los contaminantes en esta especie. En primer lugar, los hábitos pelágicos de ésta durante todo su ciclo vital respecto a las restantes, que sólo frecuentan estos ambientes durante las migraciones que llevan a cabo, ocupando el resto de sus vidas, ambientes más cercanos a las costas (neríticos), donde los niveles de contaminantes son mayores que en mar abierto. En segundo lugar y motivo que comparte con la especie *Chelonia mydas*, el tipo de dieta.

Las preferencias en la dieta de cada especie de tortuga marina muestran marcadas diferencias y han sido analizadas recientemente (Bjorndal, 1997). Las tortugas bobas, aunque son omnívoras, son principalmente carnívoras (al igual que otras especies de tortuga marina como la golfina, olivácea y la tortuga plana), a base de invertebrados bentónicos de manera principal. Sin embargo, la dieta de la tortuga láud consiste casi exclusivamente en medusas y otros organismos gelatinosos. Esta particular especialización de la dieta hace que aun siendo organismos predadores, se vean menos expuestas a los diferentes tóxicos medioambientales por estar su fuente de alimentación en niveles más inferiores de la cadena trófica, evitando así los altos niveles de contaminantes por el efecto de la biomagnificación. Los individuos más jóvenes de las tortugas verdes son omnívoros, pero al llegar a la edad madura se vuelven herbívoros, alimentándose principalmente de algas, lo que permite una menor exposición a los diferentes tóxicos al evitar mayores concentraciones a causa de la biomagnificación (Godley et al., 1998a). Los hábitos alimenticios de la tortuga carey también son diferentes al alcanzar la madurez sexual, pasando de una dieta omnívora en ambientes pelágicos a alimentarse principalmente de esponjas en hábitats bentónicos. Varios autores han descrito mayores niveles de COPs en especies carnívoras vs. herbívoras de tortugas marinas (D'Illio et al., 2011; Kampalath et al., 2006; McKenzie et al., 1999; Suzuki et al., 2012; Swarthout et al., 2010). Sin embargo, Andreani y col. (2008) observaron mayores concentraciones de algunos metales en tortugas verdes que en bobas, reflejando cómo el comportamiento de ciertos elementos en el organismo varía.

Además, es importante mencionar que las tortugas boba, por su tipo de dieta omnívora y oportunista, pueden llegar a ingerir sustancias sintéticas liberadas al mar que pueden resultar altamente tóxicas. Tal es el caso de los plásticos, aceites, petróleo, etc., cuya ingesta expone a estas tortugas marinas a la gran variedad de compuestos xenobióticos que los componen, siendo en su mayoría compuestos hidrocarburos halogenados. Las bolsas de plástico son elementos peligrosos para especies como ésta y la tortuga láud, que las suelen ingerir por su gran parecido a las medusas (Lazar and Gracan, 2011; Moore, 2008). Al ingerirlas se pueden repartir por los tractos digestivo y respiratorio causando la muerte por asfixia. Se han constatado previamente evidencias de muerte por ingestión de sustancias

sintéticas (Lazar and Gracan, 2011; Orós et al., 2005; Torrent et al., 2002). Además, su composición puede ser altamente tóxica para la mayoría de los organismos del ecosistema marino (Corsolini et al., 2000).

Finalmente, hay que señalar que la dieta afecta también a las enzimas responsables de la desintoxicación. El sistema MFOs se ha encontrado más activo en aquellas especies de mamíferos marinos con amplio espectro en la dieta que en aquellas que se alimentan de un número limitado de especies (Aguilar et al., 1999). Se ha observado que la capacidad de desintoxicar compuestos extraños es mayor en herbívoros que en carnívoros pues los primeros frecuentemente se ven expuestos a mayor número de tóxicos naturales que los últimos. Esta relación entre la capacidad de desintoxicación y la dieta ha sido postulada para explicar las diferencias de adaptación a la polución en un número de aves y especies mamíferas (Focardi et al., 1988; Fossi et al., 1988; Walker, 1980) y juega también un papel importante en la dinámica de los contaminantes en otros grupos de organismos.

Por otro lado, se ha descrito que los ratios de inducción de las enzimas asociadas al citocromo P450 por sustancias xenobióticas son sustancialmente más bajos en reptiles que aquellas observadas en mamíferos y aves (Ertl and Winston, 1998; Hecker et al., 2006). Swarthout y col. (2010) sugieren que las diferencias observadas entre tortuga marinas herbívoras y omnívoras (verde vs. golfina), puedan deberse no solo a diferencias en la exposición por el tipo de dieta sino también a diferencias en la capacidad de metabolización de ciertos contaminantes.

### 5.3.3. Edad

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

Debido a que estos contaminantes se acumulan a lo largo de toda su vida, es de esperar que animales de más edad, presenten mayores concentraciones que animales más jóvenes. En la gran mayoría de los casos estudiados por Aguilar y col. (1999) se encontró una relación positiva entre la edad y la concentración de organoclorados en cetáceos y, cuando éste no era el caso, la tendencia no quedaba clara pero nunca indicaba una disminución de la concentración. Sin embargo, en animales jóvenes y neonatos de cetáceos se han observado concentraciones más altas de algunos metales (Caurant et al., 1994; Julshamn et al., 1987; Wagemann

et al., 1998). Por otro lado se ha documentado que animales más viejos son más sensibles a los metales pesados debido a que sus mecanismos de desintoxicación enzimáticos son menos eficaces que en animales más jóvenes. Además, las mayores cantidades de Cd observadas en los animales más viejos hace que éstos estén expuestos a un mayor riesgo (Gallien et al., 2001).

Debido a que no existen métodos fiables en tortugas marinas para determinar la edad (Bjorndal et al., 1998), muchos autores han usado la medida del caparazón para evaluar las variaciones de las concentraciones de contaminantes persistentes en relación al crecimiento. Además, pocos estudios han investigado los fenómenos de bioacumulación de sustancias químicas en relación con el crecimiento en tortugas marinas (Keller et al., 2004a; Lazar et al., 2011; McKenzie et al., 1999; Ragland et al., 2011) y los resultados son contradictorios. En contraste con la teoría, algunos autores han observado que tortugas de talla mayor presentaron menores niveles de contaminación química. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo sobre tortugas verdes por McKenzie y col. (1999) se establece la relación entre la longitud curva del caparazón (LCC) y la concentración total de PCBs y *p,p'*-DDE encontrada en el tejido hepático, observando una reducción de la concentración de los contaminantes con el aumento de la talla. Los niveles de residuos en los tejidos son mayores probablemente cuando las crías de tortugas verdes son primeramente recluidas en el hábitat de desarrollo juvenil (Musick and Limpus, 1997). En esta etapa se cree que pasan por una fase omnívora pelágica situándose en niveles superiores de la cadena trófica. La principal acumulación de organoclorados podría darse en esta etapa de vida pelágica y ser subsecuentemente diluida según el animal crece y se encuentra en el estado herbívoro (McKenzie et al., 1999). Estos resultados difieren con las observaciones realizadas en especies omnívoras como las tortugas mordedoras de agua dulce en las que se obtiene una correlación positiva entre la concentración de contaminantes en tejido muscular con la longitud del caparazón. Los congéneres de PCBs más lipofílicos fueron los que presentaron a su vez una mayor correlación con la edad para la misma especie de tortuga (Hebert et al., 1993). Keller y col. (2004a) observaron la misma correlación negativa con el tamaño de tortugas boba y algunos pesticidas. Sin embargo, Lazar y col. (2011) sugirieron que esa tendencia observada pudo deberse a un muestreo sesgado de tortugas de menor tamaño. Por otro lado, algunos estudios en tortugas marinas sí han observado una correlación positiva entre la concentración de COPs y la talla (Ragland et al., 2011). Además, numerosos autores han observado correlaciones entre la carga de CIPs y el tamaño (Anan et al., 2001; Barbieri, 2009a; Day et al., 2005; Gardner et al., 2006; Gordon et al., 1998; Sakai et al., 2000). Algunos estudios en estos reptiles han apuntado al carácter específico de la especie en relación a la concentración de estas sustancias y el crecimiento (Anan et al., 2001; Ikononopoulou et al., 2011; Kampalath et al., 2006). Futuros estudios deben tratar de resolver esta cuestión mediante el examen de las concentraciones de CTPs a lo largo de la vida de las tortugas marinas, teniendo en cuenta tanto el tamaño y la latitud de las áreas de alimentación y por supuesto, la especie.

### 5.3.4. Sexo

La reproducción, cría, migración y la inanición suponen una alta demanda de energía en el cuerpo, y la toxicocinética de los contaminantes en los tejidos puede variar durante estos períodos. Aunque estos procesos han sido bien descritos en peces y mamíferos marinos (Debier et al., 2006; Debier et al., 2003a, b; Greig et al., 2007; Nicoletto and Hendricks, 1988; Van de Vijver et al., 2004), poco se sabe de las tortugas marinas. En efecto, al igual que los mamíferos marinos, las tortugas marinas también pasan por fases de migración, reproducción, inanición y puesta de huevos.

En un estudio realizado por Tanabe y col. (1997) en marsopas (*Phocoena phocoena*) en el Mar Negro, las hembras maduras analizadas mostraron niveles inferiores respecto a contaminantes organoclorados, al contrario de lo ocurrido en machos que muestran una relación directa entre la concentración de contaminantes y la edad. Estas bajas concentraciones de residuos en hembras de edad adulta han sido explicadas por la transferencia durante la lactancia de estos compuestos a sus descendientes. Además, se ha observado cómo contaminantes químicos de naturaleza lipofílica atraviesan fácilmente la membrana de la placenta hacia el feto. Este paso resulta más fácil para aquellos compuestos de bajo peso molecular. Sin embargo, la transferencia es mucho mayor durante la lactancia (7-98% según la especie y el componente) que durante el embarazo (0.5-9.4%). La cantidad total de contaminantes transferidos durante el total del ciclo reproductivo se estima en un rango de 7-100%, dependiendo de la especie y el compuesto (Aguilar et al., 1999).

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

Sin embargo, en el caso de algunos metales como Hg, selenio (Se) y Cd la transferencia a la progenie es insignificante. Por lo tanto, las concentraciones entre géneros debe ser similar y las mayores concentraciones observadas en hembras no se justifican por esta desintoxicación de las hembras. Las causas de esta diversidad no están claras. Caurant y col. (1994) concluyeron que es más probable que la variación se asocie con una diferencia en las vías metabólicas en relación a los ciclos hormonales, obviamente diferentes en los dos sexos.

Los huevos de reptiles tienen un alto contenido de lípidos, a menudo un promedio de 4 a 14% de la masa del peso húmedo (Ashpole et al., 2004; de Solla and Fernie, 2004; Roosenburg and Dennis, 2005; Speake et al., 2003). Estos compuestos lipófilos son transferidos de la hembra a los huevos. Un estudio reciente ha demostrado de manera convincente la importancia de la transferencia

materna de los contaminantes orgánicos lipofílicos en este grupo de vertebrados. Rauschenberger y col. (2007) expuso a hembras de caimanes a algunos COPs (como clordano, *p*, *p'*-DDE, toxafeno y dieldrin) observando una carga similar en sus huevos. Se ha sugerido que los contaminantes lipofílicos que se detectan en los huevos probablemente procedan de la ingesta dietética justo antes de la producción del huevo en lugar de la utilización de las grasas almacenadas (Bishop et al., 1994). Estos hidrocarburos clorados presentes en el contenido de lípidos de los huevos son absorbidos durante el desarrollo embrionario, alcanzando las concentraciones máximas justo antes de la eclosión y declinando posteriormente (Alava et al., 2006; Bishop et al., 1995). El hecho de que estas concentraciones máximas sean comparables con las concentraciones en el contenido de lípidos de los huevos recién puestos, indica que los organoclorados no son metabolizados por el embrión, o que la tasa de metabolismo es bajo en relación con la carga de huevo (Kleinow et al., 1999).

De esta manera hembras reproductoras pueden reducir sus niveles de contaminantes lipofílicos por la liberación de una parte de su carga a través de los huevos o, como en el caso de los mamíferos, a través de la leche y de la circulación a su descendencia, lo que se traduce en menores niveles de compuestos lipofílicos en hembras que en machos adultos (Borgå et al., 2004; Krahn et al., 2009; O'Shea and Tanabe, 2003; Peterle, 1991; Ross et al., 2000; Smith and Hall, 1994; Ylitalo et al., 2001). Por lo tanto, al igual que hemos comentado en mamíferos, se han observado concentraciones mayores en machos de reptiles que en hembras (Albers et al., 1986; Bishop et al., 1994; Mineau, 1982). Además, se ha sugerido que la tasa de acumulación en las hembras de la serpiente mocsín de agua (*Agkistrodon piscivorus*) es menor que en los machos (Rainwater et al., 2005).

Se ha confirmado la transferencia maternal de CTPs a los huevos en tortugas marinas (Guirlet et al., 2008; Guirlet et al., 2010). La ausencia de paralelismo con el perfil de congéneres de contaminantes organoclorados observado entre la hembra y su progenie se ha observado en diferentes vertebrados marinos (tortugas, aves y mamíferos) (McKenzie et al., 1999; McKenzie et al., 1997; Miao et al., 2001; Verreault et al., 2006) sugirieron que los grupos menos clorados son transmitidos preferentemente de la sangre a los huevos en tortugas marinas. Por otro lado, la excreción de metales a través de los huevos de las tortugas marinas ha sido también estudiada por varios autores. Sin embargo, se ha sugerido que esta ruta no constituye la principal vía de eliminación para el Pb y otros metales (Godley et al., 1999; Guirlet et al., 2008; Páez-Osuna et al., 2010a; Sakai et al., 1995; Storelli and Marcotrigiano, 2003).

Además, los niveles de contaminantes transferidos disminuyen a través de las diferentes puestas que realizan las hembras durante la misma temporada de nidificación, siendo por lo tanto los huevos de la primera puesta los que reciben mayores concentraciones de contaminantes transferidos (Guirlet et al., 2010; Perrault et al., 2011). Por lo tanto se podría asumir que las crías de tortugas nacidas de la primera puesta están más expuestas a los efectos de los contaminantes lipofílicos.

### 5.3.5. Migración o incidencia a enfermedades

Como hemos comentado, los CTPs acceden a los tejidos de las tortugas marinas y otros animales marinos principalmente a través de la dieta y la reproducción, por transferencia de las hembras a su descendencia. El grado de bioacumulación de tales contaminantes depende de la posición en la cadena trófica ocupada por una especie, su hábitat y la localización geográfica de los individuos, así como del estado de salud del individuo (Bernhoft and Skaare, 1994). Por otro lado, la condición del animal y la exposición pueden afectar el contenido de sustancias xenobióticas en los tejidos. De esta manera animales sometidos a periodos de inanición bien por largas migraciones o por enfermedad, sufrirían una movilización de las grasas (y por lo tanto de los contaminantes lipofílicos acumulados en ella) para obtener energía. Geyer y col. (1994) demostraron que el gran factor biótico que influye en la toxicidad de los contaminantes químicos lipofílicos es el contenido lipídico del organismo. Animales con altos contenidos de grasas pueden acumular y tolerar mayores concentraciones de estos contaminantes químicos, debido a que son almacenados en el tejido adiposo resultando menos accesibles a órganos y receptores. Por el contrario, aquellos organismos emaciados que necesitan movilizar sus reservas de grasas se someten casi inevitablemente a los efectos tóxicos como resultado de la movilización de los contaminantes. Ello puede resultar en un aumento de la concentración de los contaminantes menos biodegradables en el tejido adiposo remanente (Bernhoft and Skaare, 1994).

Así por ejemplo, en especies sujetas a una estricta **migración** estacional y a regímenes nutricionales, la grasa corporal puede variar de manera dramática a lo largo del año. Se ha observado en algunas ballenas cómo su peso corporal aumentaba en un 50-100% al final del período de alimentación principalmente a causa de la acumulación de grasa (Lockyer and Brown, 1981). La gran talla que presentan las ballenas se ha asociado con la necesidad de acumular cantidades sustanciales de reservas lipídicas para cubrir la migración y los requerimientos reproductivos durante los períodos de escasa o falta de alimentación (Brodie, 1975). Las variaciones nutritivas pueden dar lugar a diferencias en el contenido lipídico de los tejidos, tanto en volumen como en composición. Se han descrito cambios en huesos, riñones y otros órganos de manera significativa para un número importante de especies de mamíferos marinos (Aguilar et al., 1999).

También hay que tener en cuenta que la exposición de los individuos varía según las distancias recorridas durante la migración. La mayor parte de las tortugas juveniles observadas en las Islas Canarias proceden de la costa este de EE.UU. y en menor proporción de México y Cabo Verde (Monzón Argüello et al., 2010). Esta amplia diversidad de hábitats conduce inevitablemente a diferencias en la exposición, pues algunas tortugas se alimentan en áreas contaminadas mientras otras lo hacen en áreas prácticamente vírgenes, siendo la ingestión la ruta más probable de exposición a los contaminantes para estas tortugas (Corsolini et al., 2000).



La tortuga laúd, *Dermochelys coriacea*, migra miles de kilómetros entre las áreas de alimentación y aquellas en donde nidifica (Davenport, 1997). Así que la exposición a los contaminantes ambientales variará acorde los niveles de contaminación entre las distintas áreas visitadas por las tortugas (Keller et al., 2004a). En el estudio llevado a cabo por Guirlet y col. (2010), observaron que las hembras que tardaban tres años entre periodos reproductivos presentaban mayores concentraciones de organoclorados en sus huevos (debido a un mayor tiempo de bioacumulación) que aquellas hembras que regresaban a los dos años a la playa donde nidifica, sugiriendo de esta manera que las hembras con periodos de recuperación más amplios transmitirían mayor carga de contaminantes a sus huevos. Las épocas naturales de mayor demanda energética son aquellas durante la migración o la producción de los huevos. El hecho de que las tortugas muestren una importante pérdida de peso entre las zonas de alimentación y las de nidificación (disminuyendo en un 33% de su masa corporal) (James et al., 2005) apoya esta hipótesis (Wallace et al., 2005).

Por otro lado, la **incidencia de enfermedades** puede afectar los niveles de contaminantes en los tejidos de los organismos. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios realizados sobre la concentración de contaminantes en los distintos organismos estudiados se llevan a cabo a partir de individuos muertos. Además, en la mayoría de los casos, la causa de la muerte de estos animales no está clara, excepto en áreas en las que las interacciones pesqueras son frecuentes o se observan evidentes lesiones debido a causas antropogénicas. Existen diversas razones por las cuales un organismo enfermo puede llevar una carga anormal de contaminantes en su organismo. Por ejemplo, un animal que ha estado enfermo durante un período largo de tiempo es probable que se encuentre desnutrido o se haya alimentado de fuentes diferentes de las que constituyen su dieta habitual. Además, el daño producido por muchas enfermedades sobre órganos puede alterar la capacidad para metabolizar o excretar determinados tóxicos. Por ello resulta cuestionable si la concentración en los tejidos de dichos organismos son representativos o no de unas condiciones normales. Los efectos de un cambio en la dieta o la movilización de grasas de tejidos contaminados, particularmente si los tóxicos resultan lipofílicos, se han discutido anteriormente. En términos generales, se espera un aumento de la concentración cuando el individuo aumenta de peso. Sin embargo, los efectos de las alteraciones fisiológicas y metabólicas resultan ser desconocidos en la mayoría de los casos estudiados (Aguilar et al., 1999).

Se ha detectado una condición corporal disminuida asociada a altos niveles de contaminantes persistentes en estudios realizados en tortugas marinas (Monagas et al., 2008; Orós et al., 2009). Aunque en el estudio llevado a cabo por Monagas y col. (2008) no se pudieron asociar únicamente los altos niveles de pesticidas con las lesiones observadas en el hígado, no se descartaron los efectos crónicos del DDT como causa de muerte.

Es importante resaltar que en los estudios que realizan la medición de los contaminantes en sangre se debe tener en cuenta el estado de los animales a la hora de interpretar los resultados de dicha contaminación. Una movilización de grasa en animales enfermos o emaciados puede conllevar un aumento de los contaminantes en sangre. Previos estudios han mostrado una fuerte correlación entre los lípidos de reservas de grasa y los niveles sanguíneos de organoclorados en tortugas boba (Keller et al., 2004a), lo que indica que cuando los lípidos se movilizan (para satisfacer la demanda de energía, bien sea para la producción de huevos, ayuno o el mantenimiento de los tejidos), estas sustancias lipofílicas son liberadas en el torrente sanguíneo (Hamann et al., 2002; Kwan, 1994), y así ha sido previamente apuntado por algunos autores en tortugas marinas (Keller et al., 2004a; Orós et al., 2009; van de Merwe et al., 2010).

## 5.4. Efectos de los contaminantes sobre poblaciones de fauna salvaje

96

Las preocupaciones actuales acerca de la pérdida de componentes críticos de la biodiversidad indican que los contaminantes ambientales pueden jugar un papel clave en la disminución de muchas de las especies (Carpenter et al., 2008; Schipper et al., 2008; Stuart et al., 2004). Hay varias formas principales en que los contaminantes pueden afectar a los parámetros del ciclo de vida de las distintas poblaciones animales. Los efectos pueden ser a través de una intervención directa en la función fisiológica de un individuo, lo que resulta en cambios en el crecimiento, reproducción o incluso provocar la muerte. Además, los efectos indirectos como el cambio climático o destrucción del hábitat son igualmente importantes desde el punto de vista del crecimiento de la población. Los efectos indirectos pueden pasar desapercibidos y los efectos globales de los contaminantes sobre la población pueden ser subestimados. A lo largo de esta introducción hemos mencionado los principales mecanismos fisiológicos por los que los CTPs tienen consecuencias adversas sobre los seres vivos. En términos generales podemos decir que los contaminantes son ampliamente conocidos por afectar negativamente sobre tres aspectos, fundamentales para mantener un buen equilibrio de las poblaciones naturales: supervivencia, reproducción y crecimiento.

### 5.4.1. Efectos de los CTPs sobre la supervivencia

Los contaminantes pueden reducir la supervivencia por muchos mecanismos, incluyendo **mortalidad aguda, cáncer, supresión del sistema inmune o alterando el estado general de salud**. Hoy en día, las intoxicaciones agudas, salvo por accidente, suelen ser poco frecuentes en la naturaleza. De hecho, las concentraciones de algunos organoclorados como por ejemplo los PCBs detectadas en aguas y organismos acuáticos no parecen ser tóxicas de forma aguda para la mayoría de la comunidad acuática, pues las concentraciones

ambientales suelen estar aproximadamente en niveles de uno a dos órdenes de magnitud por debajo de las concentraciones señaladas como letales por los estudios de laboratorio. Sin embargo, se ha descrito que altas dosis de niveles de contaminantes transferidos de las madres a las crías puede provocar aumento de la mortalidad en las primeras etapas de vida. Algunos de los CTPs son transferidos de una generación a la siguiente a través de la lactancia principalmente (Fukushima and Kawai, 1981; Subramanian et al., 1988a, b; Tanabe et al., 1982), siendo el desarrollo y crecimiento de los lactantes, los estados de vida más sensibles a los efectos de las toxinas (Beckman et al., 1999; Krahn et al., 2009; Schwacke et al., 2002; Viberg et al., 2003). Además, los niveles de los contaminantes organoclorados transmitidos a los lactantes son mayores en el primer primogénito que en las siguientes descendencias (Beckman et al., 1999; Lee et al., 1996; Ylitalo et al., 2001). Fukushima y Kawai (1981) consideran que el primer descendiente del delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) recibe cuatro veces más organoclorados que los siguientes. Se cree que estos altos niveles de contaminantes pueden contribuir a la muerte en animales jóvenes (Schwacke et al., 2002).

Dejando de lado los mamíferos, en los Grandes Lagos, que están altamente contaminados por PCBs, los estados embrionarios de aves y peces a menudo sufren de edema y deformidades y consecuente muerte (Gilbertson et al., 1991; Wright and Tillitt, 1999). Fernie y col. (2001) observaron que la exposición de los huevos del cernícalo americano (*Falco sparverius*) a PCBs, provocó una mortalidad mayor en las crías de los huevos expuestos que en aquellos control. El periodo embrionario en aves también ha sido definido como el momento más sensible a los efectos de los organoclorados (Carlson and DUBY, 1973). También existen numerosas evidencias de contaminación por PAHs y sus efectos letales en estadios larvarios de peces (Eisler, 2000). La mortalidad en estadios tempranos ha sido igualmente documentada en reptiles. Se ha descrito una reducción en el éxito de eclosión y una mayor mortalidad en los cocodrilos americanos (*Alligator mississippiensis*) que habitan en el lago Apopka, un lago altamente contaminado de Florida (Guillette et al., 1994). En particular en tortugas de ambientes acuáticos, algunos estudios experimentales han destacado la misma susceptibilidad en los primeros estadios de vida a los efectos tóxicos de las sustancias químicas (Bishop et al., 1994; Bishop et al., 1996; Hebert et al., 1993). Concretamente en *Chelydra serpentina*, se observó que niveles de PCBs dentro de un rango de 52-72 µg/kg de peso húmedo ocasionaron disminución en el éxito en el nacimiento (Bishop et al., 1991). Los embriones de tortugas galápagos muestreados en zonas contaminadas por PAHs mostraron mayores incidencias a la deformación, incluyendo anomalías letales, que en otras zonas no contaminadas (Van Meter et al., 2006).

Las mayores concentraciones destacadas de CTPs en animales de vida libre se citan en mamíferos marinos, concretamente en odontocetos (Colborn and Smolen, 1996). Por el contrario, las tortugas marinas adultas no pueden acumular concentraciones letales de estos contaminantes ya que, además de vivir en

hábitats de mar abierto, se alimentan en eslabones más bajos de la cadena alimenticia que por ejemplo, los peces de los que se alimentan los mamíferos marinos. Sin embargo, algunas tortugas se alimentan en las desembocaduras de los ríos y habitan en aguas costeras y estuarios cerca de la costa donde pueden llegar mayores concentraciones de contaminantes desde sus fuentes de alimento. A pesar de ello, las tortugas marinas no pueden acumular niveles tan altos. Además, su sensibilidad a estos contaminantes es poco conocida. No obstante, se ha confirmado también la transferencia de los contaminantes acumulados a lo largo de la vida de hembras adultas de reptiles a través de sus huevos, sugiriendo que quizás éstos puedan llegar a niveles letales para un embrión en desarrollo (Alam and Brim, 2000), y por lo tanto especialmente en los huevos de sus primeras puestas (Guirlet et al., 2010). Aunque Guirlet et al. (2010) intentaron establecer una relación entre la alta mortalidad embrionaria observada en la población de tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) (Caut et al., 2006) nidificante en Guinea Francesa (la población nidificante más grande observada para esta especie) y algunos contaminantes organoclorados, los resultados de este estudio no probaron esta asociación. Sin embargo, en un estudio más reciente llevado a cabo por Perrault y col. (2011), con el objetivo de responder a la misma pregunta del porqué del bajo éxito reproductivo en esta especie, midieron concentraciones de Hg y Se. El Se juega un papel protector de la toxicidad del Hg (Perrault et al., 2011; Storelli et al., 1998a), y por lo tanto bajos niveles de Se quizás conllevan a mayor toxicidad del Hg. Estos autores probaron por primera vez evidencias del importante papel que juegan el Hg y Se con el éxito reproductivo, observando una correlación positiva entre el Se y el ratio Se/Hg con el número de crías emergidas. Por otro lado, otros autores han observado altas concentraciones de metaloides como el Zn en huevos infértiles de tortuga verde (*Chelonia mydas*) comparándolos con el vitelo de crías sanas en playas contaminadas de Turquía (Ozdilek and Ozdilek, 2007). La transferencia de la madre y el efecto de los contaminantes en las etapas iniciales de la vida en tortugas marinas deben ser estudiados más en profundidad en futuros estudios.

El **cáncer** es uno de los efectos conocidos de los CTPs en roedores de laboratorio y, posiblemente, en los seres humanos (Colborn et al., 1993; Eisler, 2000; Fitzgerald et al., 2004; Safe, 1993), siendo además en el caso de los PAHs uno de los efectos más conocidos y estudiados en numerosas especies bajo condiciones de laboratorio (Albers, 1984) y variando la sensibilidad sustancialmente entre especies animales y la inducción de tumores por los PAHs (Eisler, 2000; Neff, 1985). Sin embargo, aunque la inducción de cáncer por contaminantes se ha observado en algunas poblaciones de vida silvestre, el cáncer rara vez se ha observado en fauna silvestre. El caso de las belugas (*Delphinapterus leucas*) que viven en el lago San Lorenzo, presentan niveles tan altos de PCB y plaguicidas que sus cuerpos se consideran residuos tóxicos de acuerdo a las regulaciones canadienses. Esta población estuvo cerca de la extinción quedando sólo 500 individuos aproximadamente en 1995 (De Guise et al., 1995). Sin embargo, las poblaciones del Ártico de esta especie con menores niveles de exposición no presentan estos problemas tan graves de salud.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en estos animales del lago San Lorenzo y fue observado en el 27% de 129 animales varados muertos (Martineau et al., 2002). En otros animales marinos como el pez gato (*Ameiurus nebulosus*) y otras especies de peces, también se ha observado una prevalencia mayor a padecer tumores hepáticos y de piel en ambientes de mayor contaminación (Baumann, 1989; Chang et al., 1998).

Sin embargo el cáncer en general es difícil de vincular a consecuencias negativas sobre la población. El cáncer quizás no produzca necesariamente la muerte y generalmente se presenta en animales de mayor edad, por lo que la tasa de crecimiento de una población no se verá afectada. Por ejemplo, las tasas de cáncer en seres humanos son más altas en adultos, pero esto no afecta a la tasa de crecimiento de la población. Excepto en el caso de la fibropapilomatosis, las neoplasias en tortugas marinas son muy poco comunes. Sólo se ha documentado un caso de cáncer del tipo linfoma en una hembra de tortuga boba (*Caretta caretta*). Orós y col. (2001) diagnosticaron la muerte de este animal debido a un linfoma linfoblástico multicéntrico. Sin embargo, la fibropapilomatosis es muy frecuente en algunas poblaciones de tortugas marinas. Esta patología se caracteriza por múltiples tumores cutáneos de naturaleza fibroepitelial. Aunque no es un tumor maligno, a menudo es letal debido a que pueden cubrir los ojos, la boca o la cloaca, impidiendo así una correcta alimentación. También se ha observado una forma visceral de la enfermedad. Estudios experimentales han demostrado que un agente infeccioso subcelular y sensible al cloroformo está implicado en la etiopatogenia de estos tumores, sospechándose de un herpesvirus (Herbst et al., 1995; Herbst et al., 1996). Aguirre y col. (1994) realizaron un estudio con 10 tortugas verdes con fibropapilomatosis, con el fin de hallar una relación entre la enfermedad y la posible presencia de contaminantes orgánicos y trazas de metales pesados. Ninguno de los metales encontrados superó los valores habituales para tortugas marinas sanas, descartándose cualquier relación entre la presencia de metales pesados y la fibropapilomatosis. Se ha sugerido que la acción de agentes inmunosupresores de contaminantes ambientales podían activar a virus latentes o aumentar su virulencia (Balazs and Poley, 1991; Gamache and Horrocks, 1992; Hutchinson and Simmonds, 1991). Además, algunos autores han sospechado que los contaminantes organoclorados pueden promover los tumores mediante la supresión del sistema inmune (Aguirre et al., 1994; Schumacher et al., 1998).

Entre los posibles sistemas orgánicos afectados por la presencia de CTPs se encuentra de manera destacada el **sistema inmune**. En la revisión realizada por Keller y col. (2000) sobre inmunotoxicología en fauna salvaje, se describen numerosos trabajos que demuestran cómo los CTPs pueden suprimir el sistema inmunológico de peces silvestres, aves y mamíferos. Los pollos de charrán común (*Sterna caspia*) localizados en sitios contaminados por organoclorados en los Grandes Lagos mostraron supresión del sistema inmune (Grasman et al., 1996). Además, las concentraciones de PCB en sangre de estas aves marinas se correlacionaron significativamente con la reducción de los linfocitos T

(Grasman and Fox, 2001). Finkelstein y col. (2007) observaron alterada la función inmunológica de albatros (*Phoebastria nigripes*) por organoclorados y metales pesados como el Hg en el Pacífico Norte. Varios parámetros inmunológicos se observaron suprimidos en focas (*Phoca vitulina*) que fueron alimentadas con pescado contaminado por organoclorados del Mar Báltico (Ross et al., 1996). Lahvis y col. (1995) también observaron que el aumento de organoclorados en la sangre de delfines mulares (*Tursiops truncatus*) conllevaron inmunosupresión. El Hg ha sido asociado con efectos negativos sobre la función inmunológica en focas (Das et al., 2008). Además, mortalidades masivas de mamíferos marinos han sido vinculadas al debilitamiento del sistema inmunológico asociado a la contaminación ambiental (Aguilar and Borrell, 1994a; Dietz et al., 1989) y por lo tanto son más susceptibles a padecer infecciones (Beineke et al., 2010). Se han llevado a cabo numerosos estudios en especies de salmón sobre contaminación por PAHs, mostrando una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades aquellos peces más expuestos (Johnson et al., 2008).

En el caso de las tortugas marinas, poco se sabe sobre su sistema inmune y su relación con enfermedades. Al igual que en otros reptiles, su sistema inmunológico puede variar con los cambios estacionales, como la temperatura y el fotoperíodo o estrés. Los escasos trabajos que existen en reptiles y los efectos inmunotoxicológicos de los CTPs se han iniciado en la última década (ver revisión de Keller y col. 2006). Tangredi y Evans (1997) observaron concentraciones superiores de pesticidas en el hígado de tortuga de caja común (*Terrapene carolina carolina*) que padecían infecciones bacterianas crónicas, comparadas con otras tortugas con buena condición corporal muertas por heridas accidentales. Los efectos de los contaminantes orgánicos sobre el sistema inmune en caimanes de zonas contaminadas han sido objeto de numerosos estudios (Peden-Adams, 1999; Rooney et al., 2003). Así en juveniles de esta especie del lago Apopka se han observado alteraciones tóxicas que sugieren que la maduración de los linfocitos T puede estar alterada (Rooney et al., 2003). Yu y col. (2012) estudiaron los posibles efectos en tortugas acuáticas (*Trachemys scripta elegans*) expuestas a PCBs sugiriendo posible modulación del sistema inmune por estos organoclorados.

El efecto de los CTPs sobre el sistema inmune de las tortugas marinas ha sido poco estudiado. Keller y col. (2006) demostraron por primera vez en un estudio *in vitro* que los contaminantes organoclorados quizás modulen el sistema inmune de estos reptiles marinos. La afectación del sistema inmune por la presencia de organoclorados en tortugas boba (*Caretta caretta*) había sido previamente sugerida por la alteración del número de leucocitos en la sangre, la ratio heterófilos/linfocitos y por la proliferación de linfocitos que inducen la división celular (mitogénesis) (Keller et al., 2004c). Además se observaron correlaciones entre los CTPs medidos en sangre de *Caretta caretta* y la actividad de la lisozima y la proliferación de linfocitos T y B, incluso a concentraciones en sangre mucho más bajas que en otras especies marinas. Esto hace pensar que las tortugas boba quizás son sensibles a la modulación del sistema inmune por los organoclorados

y ciertos metales pesados como el Hg incluso a bajas concentraciones (Day et al., 2007; Keller et al., 2006). Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Komoroske y col. (2011) no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de *p,p'*-DDE y la proliferación de linfocitos.

Aunque no existen estudios relacionados con el efecto de los PAHs sobre el sistema inmune en tortugas marinas, Lutcavage y col. (1997b) documentó efectos subletales del petróleo y la salud del sistema inmunológico en tortugas bobas.

Por otro lado, los animales enfermos por lo general tienen sistemas inmunitarios debilitados. Por ejemplo, la inmunosupresión se ha visto en tortugas verdes (*Chelonia mydas*) afectadas por fibropapilomatosis, pero se desconoce si la enfermedad fue causada por la inmunosupresión o la inmunosupresión es anterior a la enfermedad (Cray et al., 2001; Work et al., 2001). También se ha citado un aumento en la proporción heterófilos/linfocitos como indicador de enfermedad en tortugas marinas (Aguirre et al., 1995; Cray et al., 2001; Work et al., 2001).

En los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia de varamientos de tortugas boba (*Caretta caretta*) debilitadas en la costa de EE.UU. (Norton et al., 2005). Estas tortugas se caracterizan por presentar severa caquexia, gran carga de parásitos externos e internos e infecciones bacterianas. Sin embargo, el origen que desencadena este estado es aún desconocido. Day y col. (2010) estudiaron la posible relación entre el Hg y diferentes parámetros clínicos en tortugas de estas características, no observando diferencias entre las tortugas sanas y aquellas debilitadas. Debido al escaso número de casos de tortugas debilitadas, no se han podido relacionar los niveles de Hg y la supresión del sistema inmune observada como origen de este estado (Day et al., 2007). Otros autores han observado aumento de niveles de ciertos CTPs en grupos de tortugas con estas características (Day, 2003; Keller et al., 2006).

En un reciente estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se asociaron las altas concentraciones de PCBs encontradas con la causa de muerte de una hembra inmadura de *Caretta caretta* que padeció pansteatitis. Además es la primera vez que se observa esta patología en estos reptiles (**ver Anexo II**).

La determinación del **estado general de salud** es otro factor importante a la hora de determinar los negativos efectos de los contaminantes ambientales sobre los seres vivos. Los parámetros hematológicos y bioquímicos son ampliamente usados para determinar el estado general de salud de cualquier especie animal. Los efectos de los contaminantes también han sido evaluados a estos niveles subcelulares en distintas especies animales. De esta manera, se han documentado los efectos tóxicos de los PCBs sobre el riñón, y sobre los diferentes parámetros bioquímicos sanguíneos, como el nitrógeno ureico en sangre y el nivel de los electrolitos, que son utilizados para confirmar la disfunción renal (McConnell, 1985). En peces, la exposición al clordano se tradujo en un aumento de la concentración del sodio y

del magnesio (Bansel et al., 1979). Otros parámetros bioquímicos como la glucosa mostraron una correlación negativa con contaminantes, como en el caso de ratas expuestas a PCBs (Boll et al., 1998; Chu et al., 1994). El aumento de la AST se usa comúnmente como indicador de daño hepatocelular en aves y mamíferos expuestos a organoclorados (Arnold et al., 1990; Feeley, 1995). Albers y col. (1986) no encontraron alteraciones en el hematocrito y en el análisis bioquímico de tortugas mordedoras con niveles importantes de organoclorados en sus tejidos.

Los estudios que muestran los potenciales efectos de los CTPs a estos niveles fisiológicos son muy escasos también en tortugas marinas (Day et al., 2007; Innis et al., 2008; Keller et al., 2004c; Swarthout et al., 2010), y los resultados son contradictorios. Previamente se han revisado en algunas poblaciones de tortugas marinas expuestas a contaminantes persistentes los parámetros generales de salud (George, 1997). Se ha observado que algunos parámetros, como la presión osmótica y la urea, sufren cambios estacionales, pero otros se mantienen relativamente constantes durante todo el año, como la glucosa y el hematocrito (Bolten and Bjorndal, 1992). En el estudio realizado por Keller y col. (2004c) se obtuvo la primera evidencia de que los compuestos organoclorados pueden afectar al estado de salud de las tortugas marinas. Aunque las concentraciones que se detectaron de estos tóxicos fueron relativamente bajas comparadas con otras especies, observaron un importante número de correlaciones entre la carga de contaminantes y parámetros generales de salud de diferentes funciones biológicas, como inmunidad y homeostasis de proteínas, carbohidratos e iones.

La alteración de parámetros hematológicos como el hematocrito y glóbulos rojos, se han observado correlacionados positivamente con PCBs, sugiriendo que estos organoclorados pueden causar anemia en tortugas marinas (Keller et al., 2004c). Además en el estudio realizado por Lutcavage y col. (1997b) las tortugas expuestas a petróleo presentaron reducido su número total de glóbulos rojos. Además, en un estudio donde evaluaron diferencias entre parámetros clínicos y las causas de ingreso de tortugas boba, se observó que las tortugas que vararon petroladas presentaron disminuciones significativas de RBC y aumento de WBC y trombocitos con respecto a tortugas clínicamente sanas (Casal and Orós, 2009).

También se han observado correlaciones significativas entre CTPs y electrolitos en tortugas marinas (Innis et al., 2008; Keller et al., 2004c). El equilibrio iónico en las tortugas marinas es regulado no sólo por el riñón, sino también por las glándulas excretoras de sal. Las glándulas excretoras de sal de las tortugas bobas concentran el sodio 8 veces más respecto al plasma y el magnesio 45 veces más y excretan el fluido resultante a través de los conductos próximos a los ojos (Vargo et al., 1986). Si el riñón o las glándulas de la sal de las tortugas marinas son sensibles a los organoclorados, como se ha visto en otras especies (McConnell, 1985), la correlación observada por Keller y col. (2004c), podría significar que los organoclorados afectan a estos órganos y al equilibrio iónico de las tortugas marinas. En un reciente estudio llevado a cabo por nuestro grupo



de investigación, se muestra por primera vez en tortugas marinas, la patología de la glándula de sal como causa de muerte en los animales estudiados. Dos de los animales analizados en este estudio mostraron unos niveles de sodio, cloro y osmolalidad aumentados debido a la disfuncionalidad de la glándula (Orós et al., 2011) (datos correspondientes al Capítulo II).

La concentración de glucosa en sangre está claramente relacionada con el estado nutricional en las tortugas boba (Lutcavage et al., 1997b). La glucosa en el plasma es estrictamente regulada por el hígado y su compleja interacción con el hipotálamo y con la hipófisis y las glándulas adrenales. Por ello, cualquier posible interferencia de los CTPs en los órganos mencionados podría ser la causa de una alteración de los niveles de glucosa en sangre. En el estudio de Keller y col. (2004c) se observó una correlación negativa entre los niveles de glucosa y la concentración de dieldrín y DDTs en el tejido adiposo de tortugas boba.

También se conoce la alteración de la actividad de las enzimas hepáticas por la presencia de organoclorados, como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la enzima málica, responsables de la regulación de proteínas, lípidos y azúcares (Boll et al., 1998). En tortugas boba, se han correlacionado valores altos en la concentración de organoclorados con una disminución del cociente albúmina/globulina (Keller et al., 2004c). En el mismo estudio se observó un aumento de la actividad de la AST y una disminución de la ALP en individuos con altos niveles de organoclorados. Debido a la falta de estudios que determinen la distribución de estas enzimas en los órganos de las tortugas marinas, resulta difícil interpretar las correlaciones observadas en este estudio. Si nos basamos en la evidencia experimental de que los organoclorados causan daños en el hígado y consecuentemente producen un aumento de la AST en plasma en mamíferos y aves, es plausible que la fuerte correlación encontrada por Keller y col. (2004c) sea un indicativo de daño hepatocelular en tortugas marinas contaminadas por organoclorados. Esta interpretación es reforzada por la ausencia de correlación entre organoclorados y actividad CPK, enzima de origen muscular. Según Campbell (1996), de un daño hepatocelular se espera que resulte un aumento de la AST, pero no de la CPK. En el estudio de Day y col. (2007) se observaron correlaciones de los niveles de Hg con aumentos de las AST y disminuciones de CPK. Sin embargo, se observó una correlación positiva entre los niveles de CPK y Hg en el estudio de Innis y col. (2008).

Todas las correlaciones observadas por diversos autores entre los niveles de CTPs y los diferentes parámetros medidos sugieren que el estado de salud de las tortugas boba se ve afectado por estos contaminantes. Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de los indicadores medidos no rebasaron los rangos establecidos para esta especie. Si bien es cierto que los rangos descritos se han concluido tras el examen de tortugas marinas de vida libre que, indudablemente, han estado expuestas a contaminantes persistentes. Además, es posible que pudieran darse efectos adversos en un animal aun cuando sus parámetros se

encuentren dentro del rango establecido para la población (Keller et al., 2004c). El hecho de que se hallara una importante correlación aun cuando los niveles de organoclorados detectados fuesen mucho menor que los encontrados para otras especies de animales sugiere que las tortugas marinas podrían ser más sensibles al impacto de los organoclorados de lo que previamente se había sugerido (Keller et al., 2004c).

#### 5.4.2. Efectos de los CTPs sobre la reproducción

Se conocen numerosos compuestos naturales y sustancias químicas capaces de mimetizar la acción de hormonas naturales e interferir de diferente manera en los normales mecanismos reproductivos (Crews et al., 2000). Es evidente que cualquier alteración que se produzca sobre la reproducción de una especie puede resultar en una grave disminución de la población. Es ampliamente conocido cómo los CTPs pueden deteriorar este punto del ciclo vital a través de multitud de mecanismos, implicando la mayoría de ellos una alteración del sistema endocrino. Los llamados DE pueden conllevar anomalías en el desarrollo, alteración de la proporción de sexos y reducir la reproducción en poblaciones silvestres (Guillette, 2000; Vos et al., 2000). Las evidencias de cómo estos contaminantes son capaces de interferir en las funciones reproductivas y endocrinas de peces, aves, anfibios, reptiles y mamíferos son numerosas (Bergeron et al., 1994; Carere et al., 2010; Crews et al., 1995; Guillette, 2000; Hotchkiss et al., 2008; Kashiwagi et al., 2008; Milnes et al., 2004).

Se han descrito numerosos ejemplos de **anormalidades del desarrollo** en fauna silvestre. Estas anormalidades pueden desencadenar una disminución en la tasa de reproducción cuando los animales alcancen la madurez sexual. Se observaron múltiples deformaciones físicas en aves que se alimentaban de peces (cormoranes y gaviotas) en los Grandes Lagos (Gilbertson et al., 1991), y altas tasas de deformaciones en las extremidades en una especie de anfibio (*Necturus maculosus*) (Gendron et al., 1994). Recientemente se ha observado que herbicidas actualmente utilizados, como la atrazina, pueden feminizar la laringe de los renacuajos masculinos (*Xenopus laevis*) y dar lugar a hemafroditas (Hayes et al., 2002b). De igual manera, algunos biocidas altamente tóxicos han producido la masculinización de caracoles (Ankley and Giesy, 1998). Los mamíferos no quedan al margen de estas alteraciones reproductivas. Wiig y col. (1998) hipotizaron que los contaminantes ambientales podían causar hemafroditismo en los osos polares; y en el estuario de San Lorenzo se observó una beluga hemafrodita (De Guise et al., 1994).

En reptiles también se han detectado numerosas alteraciones reproductivas asociadas a contaminantes. Bergeron y col. (1994) demostraron la actividad estrogénica de algunos PCBs utilizando para ello huevos de tortugas acuáticas (*Trachemmys scripta*). En la tortuga mordedora (*Chelydra serpentina*) las exposiciones a organoclorados aumentaron la incidencia de las deformidades

en las crías (Bishop and Gendron, 1998). En esta misma especie, se observó la feminización de caracteres sexuales secundarios (de Solla et al., 1998). Varios estudios han descrito anomalías reproductivas y endocrinas en cocodrilos del lago Apopka, sugiriendo que los efectos endocrinos de los compuestos organoclorados han suprimido el éxito reproductivo y contribuido a la disminución de esta población (Guillette et al., 1994). Como ejemplo de algunas de estas alteraciones, se han observado perfiles alterados de los niveles hormonales que se han asociado con penes más cortos en esta especie (Guillette et al., 1996). En este mismo lago, una tortuga acuática (*Chrysemys nelsoni*) desarrolló ovotestis (Guillette et al., 1996).

Los cambios morfológicos que ocurren durante el desarrollo embrionario de tortugas marinas han sido caracterizados por Miller y col. (1985). En términos generales el desarrollo se puede clasificar en tres fases: 1) diferenciación estructural del cuerpo y organogénesis, 2) desarrollo funcional de órganos y sistemas y 3) crecimiento embrionario. Las anomalías del desarrollo, tales como albinismo, malformaciones del pico y escudos son comunes en los embriones de tortugas marinas que no sobreviven a la incubación. Sin embargo, se desconocen las causas que lo originan. Anteriormente hablamos de cómo los CTPs lipofílicos son transmitidos de las hembras a los huevos en tortugas marinas. En la última década, varios autores han analizado las concentraciones de CTPs en huevos de diferentes especies de tortugas marinas (Alam and Brim, 2000; Alava et al., 2006; Alava et al., 2011; Lam et al., 2006; van de Merwe et al., 2010). Por lo tanto, las evidencias de que los embriones están expuestos a concentraciones de contaminantes ambientales ya desde el desarrollo embrionario son numerosas. Además, en organismos ovíparos los estadios tempranos de vida son frecuentemente más sensibles a los efectos de los contaminantes (Russell et al., 1999). Alava y col. (2006) encontraron las más altas concentraciones de COPs (4940 ng/g de lípidos) observadas en su estudio en una tortuga que presentaba dos cabezas. En un reciente estudio, crías de tortuga verde (*Chelonia mydas*) con menor índice corporal presentaron mayores concentraciones de COPs, sugiriendo que las tortugas con un menor índice corporal quizás no sobrevivan a la migración temprana y la depredación (van de Merwe et al., 2010). En otras especies de reptiles también se han descrito los efectos tóxicos de los COPs sobre los primeros estadios de vida (Bishop and Gendron, 1998; Eisenreich et al., 2009; Rauschenberger et al., 2007; Willingham, 2001).

En organismos que se reproducen sexualmente la **proporción de sexos** es un factor importante para el crecimiento de una población. Así, un menor número de hembras significará una menor descendencia, mientras que una disminución de los machos conllevará a un menor número de parejas y por lo tanto, igualmente, disminución de la población de una determinada especie. En la década de los setenta se observaron asimetrías en la proporción de sexos y feminización de gaviotas en los Grandes Lagos. Además, 20 años después, se observaron anomalías gonadales asociadas con contaminantes organoclorados en

pollos de gaviota (Fox, 2001a). Por otro lado, se ha observado una recuperación de las proporciones sexuales asociadas a disminuciones significativas en las concentraciones de 4,4'-DDE en peces que habitan en estos mismos lagos (Fox, 2001a).

La proporción de sexos en la mayoría de los reptiles se rige por el delicado equilibrio de la temperatura del nido y la síntesis de esteroides. En los embriones en los que la determinación sexual es dependiente de la temperatura (DSDT), la temperatura de incubación indicará la proporción de sexos. Se sabe que en tortugas acuáticas (*Trachemmys scripta*) a temperaturas de incubación elevadas (ej. 31°C) todas las crías resultan hembras, a temperaturas inferiores (ej. 26°C) todos son machos, y a temperaturas intermedias (entre 29°C y 30°C) se da una variedad entre machos y hembras (Wibbels et al., 1991). Sin embargo, se ha observado que, huevos de tortugas incubados a temperaturas de machos con exposición a contaminantes estrogénicos, pueden inducir el desarrollo de gónadas femeninas (Bergeron et al., 1994; Willingham and Crews, 1999). Sheehan y col. (1999) demostraron que bajas dosis de contaminantes organoclorados podían producir también la reversión de sexos en embriones de tortugas acuáticas (*Trachemys scripta elegans*), sugiriendo que no existe un patrón de dosis umbral para tal efecto. La fisiología de la determinación sexual en estas especies parece ser una combinación entre la temperatura ambiental y la concentración de hormonas. En especies con DSDT, se ha demostrado que la enzima aromatasa desempeña un papel importante en la determinación del sexo, exhibiendo sus mayores niveles de actividad a temperaturas más elevadas (donde se producirían hembras) (Crews et al., 1995). Además, el cerebro ha sido definido como el órgano capaz de recibir la señal térmica y traducir ésta en una determinada actividad de la enzima aromatasa (Milnes et al., 2002; Place et al., 2001; Willingham et al., 2000). Por lo tanto, si la síntesis de esta enzima se viese afectada por cualquier razón, la proporción de sexos se vería también alterada (Crain et al., 1997; Hayes et al., 2002a). Previos estudios de laboratorio han demostrado que contaminantes organoclorados como los PCBs alteran la actividad de la aromatasa en roedores (Gertsenberger et al., 2000). La fase embrionaria de tortugas de orejas rojas (*Trachemys scripta*) también fue sensible a estos contaminantes alterando la síntesis de la enzima (Willingham et al., 2000). De igual manera, en animales de vida silvestre como anfibios y reptiles también se han asociado los organoclorados con posibles cambios en la actividad de la aromatasa (Crain et al., 1997; Hayes et al., 2002a).

En las siete especies de tortugas marinas el sexo de las crías se define durante el segundo tercio de incubación dependiendo de la temperatura ambiente dentro del nido (Yntema and Mrosovsky, 1979). La temperatura pivotal en la cual se producen 50% de machos y 50% de hembras varía sensiblemente entre especies. Para la tortuga boba (*Caretta caretta*), la temperatura pivotal se encuentra a 29°C, por debajo de esta temperatura aumenta el número de machos producidos hasta llegar al 100% a 26°C, mientras que por encima de 29°C aumenta el porcentaje de hembras siendo el 100% a 31.5 °C (Kaska et al., 1998; Mrosovsky and Pieau,

1991; Mrosovsky and Yntema, 1980). Desvages y col. (1993) demostraron que la actividad aromatasa se ve influenciada por la temperatura en la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*). A temperaturas más altas se aumenta la actividad de la enzima aromatasa en las gónadas de esta especie (produciendo más hembras). La exposición a estrógenos invirtió el sexo de los huevos de tortugas oliváceas (*Lepidochelys olivacea*) que fueron incubados experimentalmente a temperaturas de machos (Merchant-Larios et al., 1997). Sin embargo, en el experimento de laboratorio llevado a cabo por Podreka y col. (1998) en *Chelonia mydas*, no se observó la reversión de sexos bajo la influencia del 4,4'-DDE. Más recientemente, en un estudio in vitro sobre los efectos de pesticidas (como la atrazina, *p,p'*-DDE) sobre el citocromo P450 aromatasa (enzima clave para la conversión de testosterona en estradiol), se observó cómo la atrazina aumentó la actividad de la aromatasa después de 24 horas de la exposición, y el *p,p'*-DDE inhibió la actividad pero solo a concentraciones citotóxicas (Keller and McClellan-Green, 2004). Además, los resultados de un reciente estudio también in vitro, sugieren que los plaguicidas ambientales y los metales pesados pueden alterar significativamente la unión de esteroides (como la testosterona y estradiol) a las proteínas plasmáticas (Ikononopoulou et al., 2009). Estos estudios experimentales ayudan a entender mejor la sensibilidad de los embriones de tortugas marinas a los contaminantes ambientales.

Entre los efectos indirectos de los contaminantes es importante resaltar los efectos negativos de la contaminación ambiental. En el próximo siglo se predice un cambio climático importante en un relativo espacio de tiempo corto (IPCC 2007), y afloran cuestiones sobre los posibles efectos del aumento de temperatura en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Por ello, las especies con DSDT son especies altamente vulnerables al calentamiento global (Walther et al., 2002). Actualmente, la razón de sexos en crías de las poblaciones de tortugas marinas está sesgada hacia las hembras (Godley et al., 2001; Hanson et al., 1998; Kaska et al., 1998; Marcovaldi et al., 1997; Mrosovsky et al., 1999; Mrosovsky et al., 2002), en algunos casos superando el 90% de producción de hembras (Hanson et al., 1998). Si las tortugas marinas son tan sensibles a los negativos efectos de disrupción endocrina de los contaminantes es por lo tanto posible pensar que además del efecto indirecto del cambio climático en estos reptiles (Poloczanska et al., 2009), estos contaminantes interfieren directamente en la producción de más hembras, alterando así la proporción de sexos natural en estas especies.

Los CTPs también pueden afectar directamente sobre la descendencia producida por un individuo, dando lugar a una **menor descendencia**. En estudios realizados en zonas contaminadas con PCBs (Mar de Wadden) se observaron fallos en la reproducción de focas. Las focas alimentadas con una dieta de pescado de una zona contaminada por organoclorados tuvieron menos crías que aquellas que fueron alimentadas con peces menos contaminados (Reijnders, 1986). Igualmente, se ha hipotetizado que el descenso de la población de belugas del lago San Lorenzo tiene que ver en parte a los contaminantes y la disminución de la reproducción

(De Guise et al., 1995). Recientemente, Rauschenberger y col. (2007) observaron una disminución del número de crías viables de caimán expuestas a pesticidas. Históricamente, la disminución de una reproducción efectiva del águila calva y poblaciones de cormoranes de los alrededores de los Grandes Lagos causó la disminución de sus poblaciones debido principalmente al adelgazamiento de la cáscara del huevo por el DDT (Grasman et al., 1998). Aunque este efecto ha sido ampliamente documentado en aves (Vos et al., 2000), no ha sido documentado en reptiles.

Las alteraciones en la reproducción de las tortugas marinas adultas no se han investigado debido a las dificultades logísticas de trabajar con animales que permanecen en el mar durante la mayor parte de su vida. El estudio de los machos de tortugas marinas es aún más difícil debido a que desarrollan completamente su ciclo de vida en el mar. Sin embargo, el número de tortugas marinas hembras ha disminuido en ciertas poblaciones en las últimas décadas. Estas disminuciones fueron originalmente atribuidas a causas antropogénicas directas como la caza furtiva y la captura incidental de tortugas por la pesca, principalmente. Sin embargo, todavía hoy, a pesar de los numerosos esfuerzos de conservación establecidos a nivel mundial para las poblaciones de tortugas marinas, sus poblaciones están en declive. Los contaminantes ambientales deben ser investigados como un riesgo potencial de la reducción de la reproducción de las poblaciones en tortugas marinas.

### **5.4.3. Efectos de los CTPs sobre el crecimiento**

Para una correcta supervivencia y reproducción es fundamental una tasa adecuada de crecimiento de los individuos de cualquier especie. Las hormonas tiroideas y el retinol están íntimamente implicados en el crecimiento, desarrollo, metabolismo, inmunidad y reproducción. La revisión bibliográfica de Rolland y col. (2000) muestra que existen numerosas evidencias que relacionan a los CTPs con una disminución de los niveles de la hormona tiroidea y el retinol y con alteraciones histológicas del tiroides en poblaciones de fauna salvaje. Aunque las concentraciones de COPs en focas anillada (*Phoca hispida*) del Mar Báltico se han observado disminuidas recientemente, entre los efectos de estos contaminantes se destaca la disrupción tiroidea (Routti et al., 2010). De igual manera, se han asociado anomalías tiroideas con contaminación por PAHs en gaviotas que viven en áreas contaminadas (Moccia et al., 1986). Las alteraciones de las funciones de la glándula tiroidea y del retinol pueden originar malformaciones en el desarrollo, alteración en el crecimiento, alteración de la metamorfosis de anfibios, disminución del éxito reproductivo, alteración del sistema inmunológico, enfermedades de la piel, y además, quizás alteren los comportamientos de la migración, cortejo y la reproducción (Colborn, 2002; Murk et al., 1996; Rolland, 2000).

Así, si por ejemplo la tasa de crecimiento fuese más lenta, los individuos de una especie podrían ser más susceptibles a la depredación y además retrasar la edad de reproducción. Sin embargo, si este crecimiento fuera más rápido podría conllevar alteraciones fisiológicas. En cualquiera de los dos casos la estabilidad de una población se puede ver comprometida. Algunos ejemplos de estas alteraciones asociadas a los contaminantes en reptiles son: alteración de la composición de los huesos (Lind et al., 2004), alteración de los niveles de la hormona tiroidea en hembras juveniles de caimanes de zonas contaminadas (Crain and Guillette, 1998), cambios en el crecimiento de tortugas de orejas rojas (Willingham, 2001), caracteres sexuales masculinos feminizados y alteración de la morfología del dimorfismo sexual en tortugas mordedoras (de Solla et al., 2002; de Solla et al., 1998). Un reciente estudio en crías de tortugas acuáticas demostró los efectos debido a la exposición de PCBs durante su desarrollo juvenil, mostrando una disminución de la tasa de crecimiento y un aumento de la mortalidad en esta etapa (Eisenreich et al., 2009). Tales efectos latentes de los contaminantes derivados de la madre sugieren que las evaluaciones de impacto ambiental en estudios a corto plazo pueden proporcionar estimaciones de la gravedad de los efectos a largo plazo. Holliday y col. (2009) también observaron retrasos del crecimiento asociados a concentraciones de congéneres de PCBs.

Los neonatos de tortugas marinas y pequeños juveniles son extremadamente vulnerables a la depredación, por lo tanto si las tasas de crecimiento se viesen además alteradas, la supervivencia posiblemente disminuiría considerablemente (por un aumento de esta depredación). Además, la reproducción se reduciría ya que la edad de maduración también se vería retrasada por una ampliación de la etapa juvenil. Las tortugas marinas requieren décadas para alcanzar la madurez sexual (Bjorndal et al., 2003; Chaloupka and Limpus, 1997; Limpus and Chaloupka, 1997), lo que les hace especies aún más sensibles a alteraciones en esta etapa.

Las hormonas tiroideas, incluyendo T4 y T3 se pueden medir en el plasma de las tortugas marinas. Se ha demostrado que la hormona T3 influyen en el desarrollo pulmonar de los embriones de *Chelonia mydas* (Owens, 1997; Sullivan et al., 2001). El efecto de los contaminantes sobre las funciones del tiroides en las tortugas marinas aún no ha sido estudiado.





# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	113
---------------------------------	-----

## Justificación y objetivos

En los últimos 50 años, los efectos directos e indirectos del creciente desarrollo humano sobre el medio ambiente, han desencadenado una situación severamente comprometida para todas las especies de tortugas marinas. La pesca no selectiva indiscriminada, el saqueo de huevos o la caza de tortugas para consumo, el desarrollo costero y la contaminación marina son las principales amenazas a nivel mundial a las que se encuentran expuestos estos reptiles. Esta situación de alarma ha despertado un creciente interés por la conservación de estas especies, realizándose numerosos esfuerzos encaminados a un mayor conocimiento y protección de estos singulares vertebrados marinos.

Sin embargo, a pesar del enorme progreso que se ha realizado en las últimas décadas, numerosas son las incógnitas que debemos resolver. El desconocimiento de aspectos clínicos fundamentales para una correcta rehabilitación de tortugas varadas, o el comportamiento de determinados parámetros de salud a los negativos efectos de sustancias químicas presentes en el medio ambiente, son algunas de las tareas pendientes que deben ser investigadas. Parámetros clínicos como el pH, gases sanguíneos y electrolitos han sido escasamente estudiados en tortugas marinas. El buen conocimiento de estos parámetros es necesario para interpretar el grado y tipo de deshidratación que presenta un animal accidentado o enfermo. Referencias de valores fisiológicos de estos parámetros son fundamentales para el establecimiento de correctas terapias médicas que ayuden al proceso de rehabilitación. Además, ciertas patologías pueden afectar directamente los niveles plasmáticos de estos parámetros clínicos, siendo fundamental su estudio y evaluación en el marco de medidas dirigidas a la conservación de estas especies.

Por otro lado, a lo largo de la Introducción de esta Tesis Doctoral, hemos visto cómo en la sociedad del siglo XXI vivimos rodeados de un cóctel de sustancias químicas con capacidad de interactuar con los animales y el hombre y que son capaces en muchos casos de producir efectos adversos sobre la salud.

La Organización de las Naciones Unidas ha trabajado durante los últimos 25 años para alcanzar acuerdos que minimicen y eliminen los riesgos de la contaminación química. En el marco legislativo, los convenios internacionales han dado prioridad en sus políticas al tratamiento de las sustancias tóxicas y peligrosas. Muchos de estos acuerdos identifican como objetivo prioritario las sustancias persistentes, tóxicas y bioacumulativas y en especial a los organohalogenados. El Convenio de Estocolmo es el instrumento internacional que regula el tratamiento de las sustancias tóxicas, auspiciado por el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Este convenio ha sido el resultado de largos años de negociación para obtener compromisos legales de los países que obligue de manera urgente la eliminación de los Compuestos Orgánicos Persistentes (COPs) más tóxicos.

114

---

Los COPs son un conjunto de sustancias químicas que comparten cuatro características básicas: (1) son tóxicos para la salud animal y humana y contaminan el medio ambiente; (2) son "orgánicos" por tener carbono en su estructura química, lo que los hace ser solubles en grasas y permite que se bioacumulen y biomagnifiquen a lo largo de las cadenas alimentarias; (3) son persistentes ya que duran años o décadas antes de degradarse; y (4) pueden desplazarse a grandes distancias. Estas propiedades intrínsecas de los COPs forman una combinación peligrosa que hace que sea prácticamente imposible controlarlos efectivamente una vez liberados en el ambiente. Los COPs actúan de numerosas formas e interfieren en procesos biológicos fundamentales para los seres vivos. Por lo tanto, son capaces de afectar la salud de los seres vivos incluso en cantidades muy pequeñas, medidas en partes por millón o incluso partes por trillón. Los efectos en la salud pueden ser inmediatos o bien manifestarse mucho tiempo después o incluso a las generaciones sucesivas. Los efectos crónicos producidos por los COPs incluyen el cáncer, problemas reproductivos, alteración del sistema inmunológico, lo que baja las defensas del cuerpo y lo hace más propicio a contraer otras enfermedades, efectos de la disrupción hormonal y alteraciones en el comportamiento, entre otros. Es importante destacar que los COPs incluidos en el Convenio de Estocolmo, al igual que otras sustancias químicas, son disruptores endocrinos, es decir, causan desequilibrios hormonales debido a que pueden imitar, sustituir o inhibir la acción de las hormonas, lo que provoca un gran número de reacciones bioquímicas incontroladas.

Los COPs liberados en el ambiente se disuelven en los tejidos grasos de vegetales y animales y se van concentrando en ellos, a través de un proceso denominado bioacumulación. Esta concentración se biomagnifica, es decir, aumenta en cientos e incluso millones de veces, en la medida en que los organismos expuestos a los

COPs son devorados por sus depredadores, lo que hace que estos contaminantes se desplacen por los diferentes eslabones de las cadenas alimentarias. De este modo, los COPs alcanzan las concentraciones más altas en las especies que están en los niveles más elevados de las cadenas alimentarias.

Además de los COPs también preocupan por comportarse de forma muy similar, algunos compuestos inorgánicos, presentes de forma natural en el ambiente, pero que debido a las actividades humanas han sido concentrados cientos de miles de veces en determinadas regiones del planeta. Compuestos de metales no esenciales (como por ejemplo el arsénico, cadmio, mercurio o plomo) se comportan en este sentido como los COPs ya que también resultan tóxicos para los seres vivos a dosis muy bajas, pueden comportarse como disruptores endocrinos, son capaces de distribuirse por el medioambiente y son igualmente capaces de incorporarse a los seres vivos a través de la cadena alimentaria. Es por esto que se habla de Contaminantes Tóxicos Persistentes (CTPs), cuando se quiere incluir tanto a los compuestos orgánicos como a los inorgánicos.

Por los riesgos que entrañan los CTPs en los seres vivos, conocer la exposición de las tortugas marinas a estos contaminantes se plantean como uno de los temas prioritarios en la conservación de estos reptiles. El acceso a animales silvestres marinos es frecuentemente complicado y es por ello que la mayor parte de los estudios se han realizado en tejidos de animales muertos. De esta manera, disponemos de una amplia bibliografía de los niveles de contaminación en diferentes tejidos de tortugas marinas. Sin embargo, mientras algunas poblaciones han sido ampliamente estudiadas, otras como la población de tortuga boba de Cabo Verde carecen por completo de información. Algunos autores han publicado niveles de contaminación en tejidos de *Caretta caretta* varadas muertas en el Atlántico Este, pero no existen datos de niveles de contaminación en tortugas vivas en estas aguas.

Recientemente se ha demostrado la utilidad de la muestra sanguínea como un método no letal para monitorizar los niveles de CTPs en tortugas marinas. La utilización de métodos que no impliquen la muerte de los animales es fundamental en especies que se encuentran protegidas. Además, las ventajas de los modernos analizadores químicos de alta sensibilidad, permiten incluso con cantidades de muestra relativamente pequeñas, la determinación de sustancias químicas en animales vivos.

Por otro lado y como hemos visto, no existen muchos estudios que evalúen los efectos sobre la salud de las tortugas marinas o su descendencia de los CTPs. Además, escasos estudios han investigado los efectos de estos contaminantes sobre parámetros generales de salud. Una alta sensibilidad de las tortugas marinas a los efectos de los contaminantes ambientales ha sido previamente postulada debido a las numerosas correlaciones encontradas entre algunos contaminantes y parámetros sanguíneos, incluso a bajas concentraciones.

Por todo lo expuesto, en esta Tesis Doctoral se plantean como **OBJETIVOS PRINCIPALES** los siguientes puntos:

**1. Documentar valores de referencia de pH, gases sanguíneos, equilibrio ácido-base y parámetros bioquímicos en tortugas boba juveniles varadas. Esto permitirá evaluar los desequilibrios ácido-base y bioquímicos que presentan las tortugas en el momento del ingreso al hospital. Además se estudiarán diferencias entre las causas de ingreso y la evolución de las tortugas y los valores bioquímicos obtenidos.**

**2. Evaluar la afectación de niveles de electrolitos en tortugas que presentan una afectación de la funcionalidad de la glándula de sal.**

**3. Monitorizar niveles de CTPs en tortugas boba vivas del Este del Atlántico, estudiando las posibles diferencias temporales y geográficas de niveles de contaminación en diferentes grupos de tortuga boba: juveniles vs. adultas. Además, en las tortugas juveniles se monitorizarán los niveles de CTPs durante diferentes momentos del periodo de rehabilitación de las tortugas y se evaluarán diferencias entre las distintas causas de ingreso y el tamaño de los animales varados.**

**4. Evaluar los potenciales efectos de los CTPs sobre parámetros generales de salud en ambos grupos de tortugas.**

# MATERIAL Y MÉTODOS

1. Área de estudio y muestreo
2. Análisis clínicos
3. Análisis toxicológicos
4. Análisis estadístico de los datos



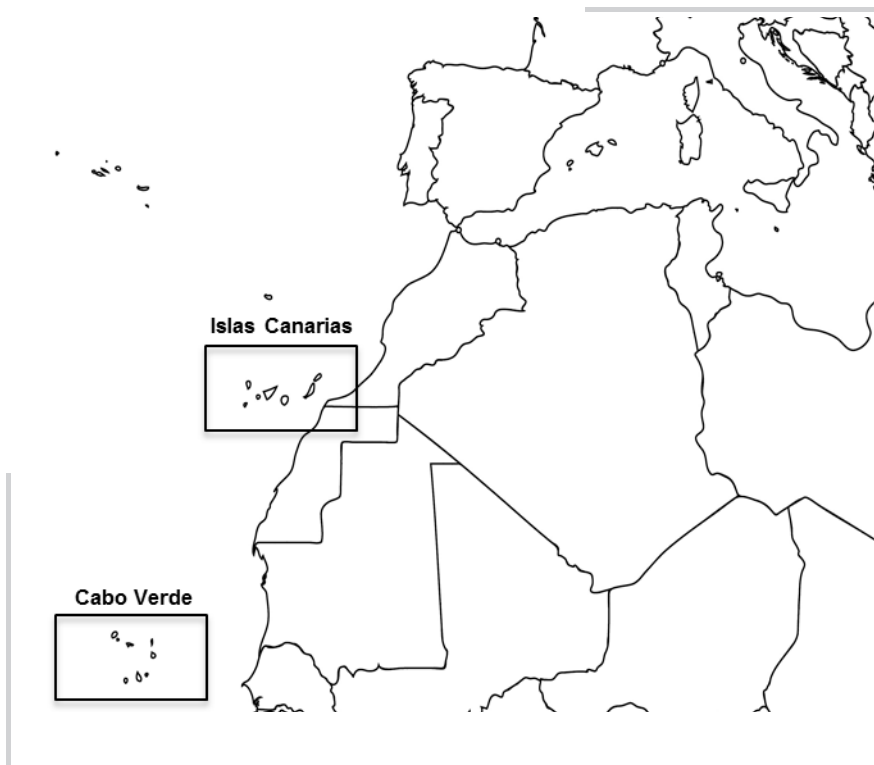
## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>1. Área de estudio y muestreo</b> .....	119
1.1. Archipiélago de Canarias .....	120
1.1.1. Toma de datos y muestreo .....	120
1.2. Archipiélago de Cabo Verde .....	122
1.2.1. Toma de datos y muestreo .....	123
1.3. Almacenamiento y tratamiento de muestras previo a los análisis clínicos y toxicológicos .....	124
<b>2. Análisis clínicos</b> .....	125
2.1. Análisis hematológicos .....	125
2.1.1. Recuento total de eritrocitos .....	125
2.1.2. Recuento total de leucocitos .....	126
2.1.3. Recuento diferencial leucocitario .....	126
2.1.4. Estimación del número de trombocitos .....	127
2.1. Análisis bioquímicos .....	127
<b>3. Análisis toxicológicos</b> .....	128
3.1. Generalidades .....	128
3.2. Material, reactivos e instrumental .....	129
3.2.1. Reactivos .....	129
3.2.2. Material .....	132
3.2.3. Aparatos auxiliares .....	133
3.2.4. Instrumentación analítica y accesorios .....	134
3.3. Procedimientos .....	135
3.3.1. Preparación de patrones y materiales de referencia .....	135
3.3.1.1. Preparación de soluciones de fortificación de los COPs .....	135
3.3.1.2. Fortificación con COPs de muestras de plasma .....	135
3.3.1.3. Preparación de rectas de calibrado de COPs .....	136
3.3.1.4. Preparación de rectas de calibrado de CIPs .....	137
3.3.2. Preparación de las muestras .....	137
3.3.2.1. Preparación de las muestras de plasma para el análisis de COPs .....	137
3.3.2.2. Extracción .....	138
3.3.2.2. Preparación de muestras de sangre para el análisis de CIPs .....	138
3.3.3. Análisis químico .....	138
3.3.3.1. Análisis de COPs .....	138
3.3.3.2. Análisis de CIPs .....	145
<b>4. Análisis estadístico de los datos</b> .....	147



## 1. Área de estudio y muestreo

Los ejemplares de tortuga boba incluidos en este estudio fueron muestreados en dos zonas diferentes: Gran Canaria (Islas Canarias, España) y la isla de Boavista (República Independiente de Cabo Verde). Ambos archipiélagos están situados en el este del Océano Atlántico (**Figura 1**), formando junto con los Archipiélagos de las Islas Azores y Madeira la Región de la Macaronesia.



**Figura 1.** Mapa del noreste del Océano Atlántico señalando los Archipiélagos de muestreo.

## 1.1. Archipiélago de Canarias

El Archipiélago de Canarias se encuentra a 1.600 kilómetros de distancia al suroeste de España, en el Océano Atlántico, y apenas 100 kilómetros del punto más próximo de la costa del norte de África (suroeste de Marruecos). Está formado por 7 islas de origen volcánico que se dividen administrativamente en dos Provincias: Las Palmas (que incluye las islas Gran Canaria, Fuerteventura y Lanzarote) y Santa Cruz de Tenerife (integrada por las islas de Tenerife, La Palma, La Gomera y El Hierro). Si bien desde una perspectiva histórica, económica, política y socio-cultural las Islas Canarias son completamente europeas es de destacar el hecho de que, geográficamente, las islas son parte del continente africano.

Las Islas Canarias debido a su posición geográfica, el carácter insular y su origen volcánico constituyen importantes áreas de alimentación para las tortugas y otras especies marinas. De las siete especies de tortugas marinas conocidas en el mundo, cinco de ellas recalán en las costas de las Islas Canarias (*C. mydas*, *D. coriacea*, *E. imbricata*, *L. olivacea* y *C. Caretta*). Sin embargo es esta última la especie más frecuente, y es por ello que la tortuga boba es la especie elegida para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral.

Los ejemplares de *Caretta caretta* que habitan en las aguas canarias son individuos juveniles o subadultos (Bjorndal et al., 2001). Según los estudios genéticos de Monzón-Argüello y col. (2010) los ejemplares de tortuga boba presentes en estas aguas proceden en su mayoría de la población del Sur de Florida (44-78%), procediendo el resto del Noreste de Florida - Carolina del Norte (7-26%), Cabo Verde (6-17%) y México (2-9%).

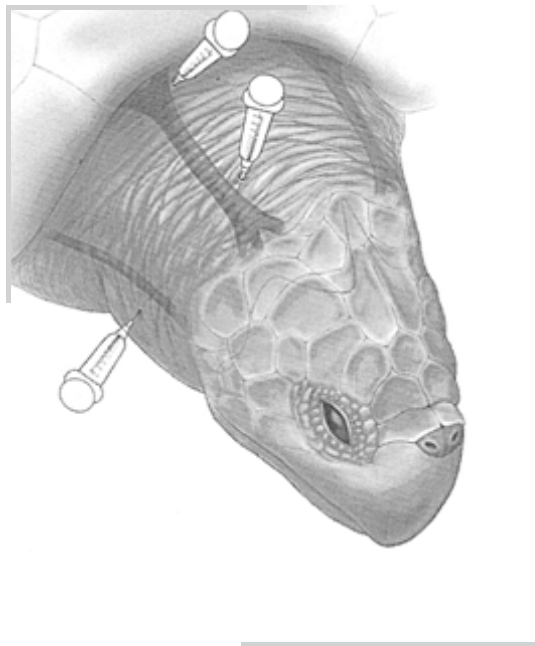
### 1.1.1. Toma de datos y muestreo

Los ejemplares de tortuga boba muestreados en este Archipiélago fueron animales que vararon o fueron encontrados en aguas de diferentes islas. Todas las tortugas ingresaron en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS) de Tafira. El CRFS de Tafira es un hospital creado en la isla de Gran Canaria a mediados de la década de los 80 para la atención a la fauna silvestre accidentada, perteneciente al Cabildo de Gran Canaria. Desde hace más de una decena de años tienen una intensa línea de trabajo con la fauna marina y, especialmente, con la recuperación de tortugas marinas. Debido a la carencia de Centros de Recuperación en las islas menores del Archipiélago, y gracias a la colaboración de la compañía aérea Binter en el traslado de animales entre islas, los Cabildos Insulares de Fuerteventura, La Gomera, La Palma y el Hierro envían las tortugas enfermas o heridas al CRFS de Tafira para su recuperación. No obstante, la gran mayoría de las tortugas que se muestrearon en este trabajo fueron encontradas en las costas o aguas cercanas a la isla de Gran Canaria.

Todos los ejemplares estudiados fueron muestreados durante los años 2007-2011. Las muestras sanguíneas destinadas a la monitorización de COPs se tomaron entre los años 2007-2010 a partir de 162 tortugas (**datos correspondientes al Capítulo III y IV**). En el año 2011 se obtuvieron las muestras sanguíneas (n = 63) destinadas a la determinación de concentraciones de CTPs en diferentes momentos del periodo de rehabilitación de las tortugas marinas (para la determinación de los CIPs sólo se obtuvieron un total de 22 muestras). Además, otras 30 muestras sanguíneas obtenidas en 2011 se utilizaron para el estudio de la evaluación de los potenciales efectos de los CTPs sobre el estado general de salud (**datos correspondientes al Capítulo de libro número VII**).

Como es habitual en la extracción de sangre en tortugas marinas, las muestras sanguíneas (6 ml) se obtuvieron de los senos venosos cervicales dorsales (vena y plexo venoso post occipital y senos asociados), empleando la técnica de extracción descrita por diferentes autores (**Figura 2**) (Bentley and Dunbar-Cooper, 1980; Bolten and Bjorndal, 1992; Lutz and Dunbar-Cooper, 1987; Owens and Ruiz, 1980). Se debe efectuar una buena técnica de extracción para evitar la contaminación de la muestra con fluido linfático, muy abundante en esta zona (Bradley et al., 1998; Gottdenker and Jacobson, 1995). Para la toma de muestras se usaron agujas (tamaño 20 G) y jeringuillas (de 5 ml) estériles.

A todas las tortugas se les tomaron medidas de longitud curva y recta del caparazón (LCC y LRC) además del peso. Las medidas se tomaron con un calibrador (para la medida recta) y un metro (para la medida curva).



**Figura 2.** Los senos venosos cervicales dorsales y la vena yugular son puntos de elección para la extracción de sangre en tortugas marinas (tomado de Whitaker and Krum, 1999).

## 1.2. Archipiélago de Cabo Verde

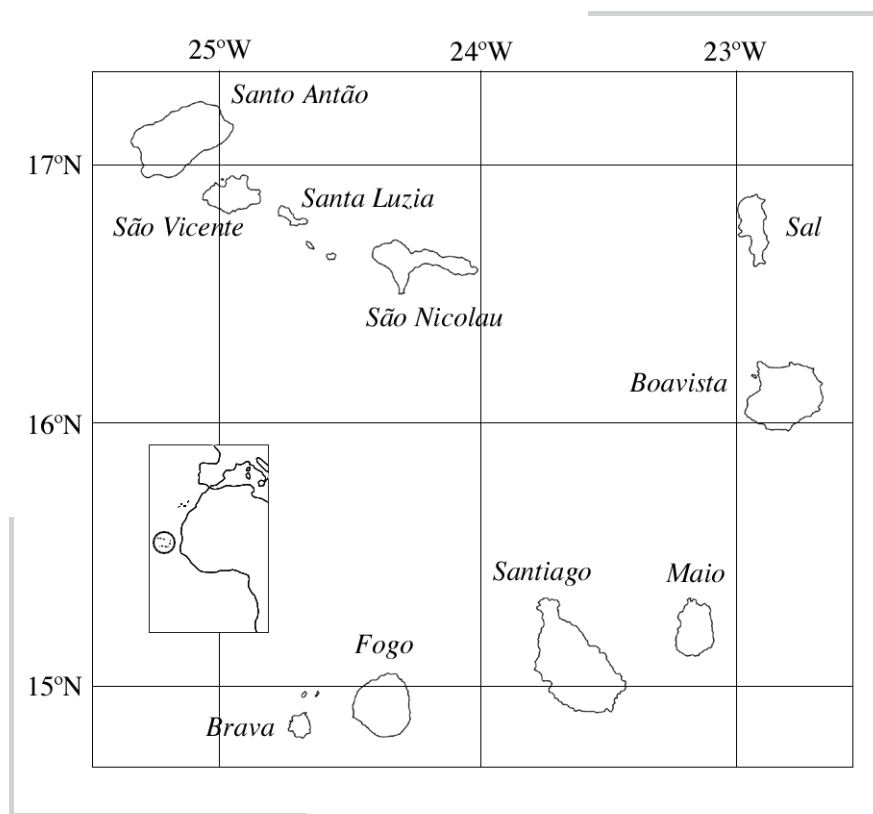
El archipiélago de Cabo Verde se encuentra a unos 500 km frente al Cabo Verde, Senegal, al que debe su nombre. Está compuesto por 10 islas volcánicas que se dividen en dos grupos: las de Barlovento en el norte (Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal y Boavista), y las de Sotavento en el sur (Maio, Santiago, Fogo y Brava). Cabo Verde es una República independiente que fue colonia portuguesa hasta el año 1975.

Las mismas cinco especies de tortugas marinas que nombramos en Canarias pueden ser encontradas en las aguas de este país: *C. mydas*, *D. coriacea*, *E. imbricata*, *L. olivacea* y *C. Caretta* (López-Jurado et al., 2000a). Cabo Verde constituye la segunda área más importante de nidificación para la tortuga boba del Océano Atlántico (y la tercera del mundo), siendo la única especie que nidifica en este Archipiélago y por lo tanto la especie más abundante. Las nidificaciones de esta especie se dan en las islas de Sal, Boavista, Maio, São Vicente, Santo Antão, São Nicolau and Santiago. No obstante, la isla de Boavista es la que alberga el mayor número de nidificaciones (alrededor del 85-90%), donde la población está censada en más de 15,000 nidos por año (Marco et al., 2012).

Boavista es la isla que se encuentra más al este del Archipiélago (15° 58' -16° 13' N 22° 40' -22° 58' W; **Figura 3**). Desde 1998 la ONG Cabo Verde Natura 2000 opera en esta zona desarrollando un importante programa de conservación de tortugas marinas. Este programa incluye monitorear y proteger las playas de nidificación, favorecer la protección con leyes locales, investigación, protección ambiental y la implementación de programas de educación ambiental dirigidos a la población local (López Jurado et al., 2000b). Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral dos campamentos pertenecientes a esta ONG trabajaban en diferentes áreas de la isla, el Campamento de Porto Ferreira (noreste) y el Campamento de Ervatão (sureste). La toma de muestra se realizó en las playas adyacentes a las instalaciones del Campamento de Ervatão, que es el área que concentra el 65% de la nidificación total de la isla. Concretamente, las playas de Ponta Cosme y Ervatão son las playas principales del campo de trabajo de Ervatão de la ONG Cabo Verde Natura 2000.

### 1.2.1. Toma de datos y muestreo

Monitores y voluntarios del campamento internacional dirigido por la ONG Cabo Verde Natura 2000 realizan seguimientos tanto de día como de noche en las playas de nidificación con el objetivo de recopilar datos como: marcaje de hembras nidificantes, tamaño de las hembras nidificantes, tamaño de puestas, conteo de rastros por playa y por día, éxitos de eclosión, tamaño de las crías nacidas, porcentajes y causas de depredación, otras causas de pérdidas de nidos, etc.



**Figura 3.** Mapa de la República de Cabo Verde.

El muestreo de las hembras adultas de tortuga boba se realizó durante los meses de verano (julio, agosto y septiembre), época que coincide con la temporada de nidificación en la isla. Las muestras fueron obtenidas en coordinación con el trabajo que se realiza en la playa durante la noche (tomar medidas, insertar PIT en caso de ser necesario, etc...). Todas las muestras se obtuvieron durante los años 2009-2011. Las muestras sanguíneas destinadas a la monitorización de COPs se tomaron entre los años 2009-2010 a partir de 205 tortugas (**datos correspondientes al Capítulo III y IV**). Durante los años 2010-2011 se tomaron las muestras sanguíneas para la cuantificación de CIPs en sangre de tortuga boba (n = 201) (**datos correspondientes al Capítulo V**). Además, durante la temporada de nidificación de 2011 se tomaron 50 muestras sanguíneas que se utilizaron para el estudio de la evaluación de los potenciales efectos de los CTPs sobre el estado general de salud de hembras adultas sanas (**datos correspondientes al Capítulo de libro VI**).

La extracción sanguínea se realizó en el momento del regreso de las hembras al mar, después de que la hembra terminase su proceso natural de nidificación (en el caso de que su salida a la playa fuera exitosa). La muestra sanguínea se obtuvo por el mismo procedimiento explicado con anterioridad.

Por razones logísticas, en el caso de las tortugas de Cabo Verde, se tomó únicamente la medida de LCC.

### 1.3. Almacenamiento y tratamiento de muestras previo a los análisis clínicos y toxicológicos

Inmediatamente a la obtención de la muestra se procedió a la elaboración de los frotis sanguíneos (los análisis hematológicos se realizaron únicamente, y como hemos dicho, en las tortugas muestreadas en el año 2011 de ambas zonas geográficas). Para la preparación de los frotis se emplearon 2 portaobjetos, de bordes romos, para evitar la rotura celular (Hawkey and Dennet, 1989).

Seguidamente, se realizó la determinación del hematocrito, mediante el método microhematocrito. Para ello, se introdujo la sangre fresca de cada ejemplar en un capilar de microhematocrito (Hirschmann® laborgerate) centrifugándose a 12,000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga (M-24. BOECO Germany). Esta determinación se realizó inmediatamente en el caso de las tortugas muestreadas en Canarias, mientras que en las de Cabo Verde, por cuestiones logísticas, se hizo en las 12-24 horas posteriores a la extracción de la sangre.

124

La sangre restante se almacenó en tubos con heparina de litio y se conservó a 4°C hasta su procesado. El anticoagulante elegido fue la heparina de litio, debido a que el usado en mamíferos, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), generalmente causa hemólisis en algunas especies de reptiles, especialmente en los quelonios; lo cual no sucede usando heparina de litio (Bolten et al., 1992; Campbell, 1996; Hanley et al., 2004; Jacobson, 1992).

Para la obtención del plasma de cada muestra sanguínea, y una vez determinados los valores hematológicos (recuentos globales de eritrocitos y leucocitos), se procedió a la centrifugación de la muestra durante 5 minutos a 10,000 rpm para la obtención de plasma. Seguidamente se separó el plasma utilizando una jeringa y aguja estériles y se almacenó a -20°C hasta su análisis bioquímico y toxicológico (en el caso de los COPs). Para la determinación de los CIPs se congeló a -20°C 1 ml de sangre entera conservado en tubos de heparina de litio.

En reptiles, el tiempo necesario para la formación del coágulo en las muestras séricas es impredecible. Por ello es preferible la utilización del plasma, y no del suero, para la realización de las técnicas de bioquímica sanguínea (Bolten and Bjorndal, 1992; Campbell, 2004; Jacobson, 1992). Además, el plasma debe recogerse lo antes posible para evitar la hemólisis de la muestra (Wilkinson, 2004).

## 2. Análisis clínicos

Los análisis hematológicos de las muestras de tortugas de las Islas Canarias se realizaron en el laboratorio del CRFS de Tafira, mientras que los de las tortugas de Cabo Verde se realizaron en el laboratorio de la ONG Cabo Verde Natura 2000, cuya sede se encuentra en la Vila de Sal-Rei (Boavista).

### 2.1. Análisis hematológicos

#### 2.1.1. Recuento total de eritrocitos

Se empleó un método directo de medición, el Natt & Herrick (Campbell, 1988; Natt and Herrick, 1952). Este método es el utilizado por muchos autores para la determinación de los recuentos globales de eritrocitos y blancos en reptiles, incluyendo tortugas marinas y otros quelonios (Casal et al., 2009; Cuadrado et al., 2002; Fontenot et al., 2004; Harr et al., 2001; López-Olvera et al., 2003; Montilla et al., 2006).

Para preparar la técnica se deben mezclar los siguientes reactivos por el orden indicado (Campbell, 1988; Natt and Herrick, 1952):

NaCl: 3.88 g.  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.50 g.  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O: 2.91 g.  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.25 g.  
Formalina (37%): 7.50 ml.  
Violeta de metilo 2B: 0.10 g.

Seguidamente se añade agua destilada hasta obtener un volumen de 1,000 ml. La solución se deja reposar toda la noche y al día siguiente se filtra (papel de filtro Whatman nº 2) y queda preparada para su utilización.

Para proceder a diluir la sangre con el diluyente elegido se utilizó la pipeta hemocitométrica de Thoma (con la perla roja) empleando una dilución de 1/200, aspirando la sangre con la pipeta hasta la marca de 0.5 y hasta la marca 101 con el diluyente Natt & Herrick, mezclando lentamente la dilución durante aproximadamente 5 minutos.

Para realizar el recuento empleamos la cámara de Neubauer (Marienfeld Germany 5 mm<sup>2</sup>), llenándola con la mezcla realizada y procediendo al recuento de las células presentes en los cuadrados de las 4 esquinas y el central del gran cuadrado central de la cámara, empleando el microscopio con el objetivo de 40x. El número de células contadas en los cuadrados correspondientes de la cámara se multiplica por 10,000 obteniéndose el número de eritrocitos por µl de sangre (Campbell, 1996; Campbell, 2004).

## 2.1.2. Recuento total de leucocitos

En reptiles, los recuentos totales de leucocitos deben hacerse por métodos manuales; esto se debe a la existencia de trombocitos y eritrocitos nucleados, que impiden el uso de los contadores celulares electrónicos (Campbell, 1996; Campbell, 2004; Wilkinson, 2004).

Para realizar el recuento de leucocitos, se empleó el mismo método usado en el recuento total de eritrocitos, que es el denominado "método de Natt & Herrick", por considerarse que valora de forma más precisa el recuento de leucocitos que la otra técnica de medición más empleada (el sistema eosinophil unopette) (Fontenot et al., 2004). Así, se empleó el diluyente Natt & Herrick y la pipeta hemocitométrica de Thoma (en este caso con la perla blanca), usando una dilución de 1/20.

Para realizar el recuento se utilizó también la cámara de Neubauer. Se cuenta el número de células presentes en los 4 cuadrados grandes de las esquinas de la cámara. El número de leucocitos contados se multiplica por 50 obteniéndose el número de leucocitos por  $\mu\text{l}$  de sangre (Campbell, 1996).

## 2.1.3. Recuento diferencial leucocitario

Los frotis sanguíneos se tiñeron 1 hora después de su obtención, una vez secados al aire, siendo recomendable efectuar la tinción de las extensiones lo antes posible para preservar mejor la morfología celular (Raphael, 2003).

Una vez realizadas las extensiones sanguíneas y posterior secado al aire, se efectuaron las tinciones hematológicas. Las tinciones hematológicas rápidas son útiles para evaluar los frotis sanguíneos de los quelonios (Wilkinson, 2004), como son las tinciones tipo Romanowsky (Wallach and Boever, 1993). En este trabajo se utilizó un método rápido de tinción, el Diff quick® (DQ) (Panóptico rápido. In Vitro Diagnosticum, QCA), basado en tinciones tipo Romanowsky (Work et al., 1998) ya que otorga suficiente calidad en las extensiones sanguíneas como para realizar una correcta identificación y caracterización de las células sanguíneas (Barrows et al., 2004). Este método ha sido utilizado por distintos autores para evaluar las células sanguíneas de los quelonios (López-Olvera et al., 2003) y tortugas marinas (Casal and Orós, 2009; Montilla et al., 2006). Se trata de una modificación de la técnica de Wright, que convierte los cuatro minutos clásicos del proceso en tres etapas de una duración aproximada de 15 segundos. La técnica se desarrolla en 4 pasos:

- 1º, la preparación sanguínea se introduce en el fijador, (disolución metálica de triarilmetano) durante 5 segundos (u 8 inmersiones).

- 2º, se quita el exceso de fijador, sin aclarar, y se sumerge el portaobjetos en el colorante rojo (solución tamponada ácida de xanteno, eosina) durante 5 segundos (u 8 inmersiones).



3º, se quita el exceso de colorante, sin aclarar, y se introduce en el colorante azul (solución tamponada alcalina, hematoxilina) durante 5 segundos (u 8 inmersiones).

4º, Finalmente la preparación se aclara suavemente con agua corriente destilada hasta observar que el agua se vuelve cristalina y posteriormente se seca al aire.

Una vez secas, las preparaciones sanguíneas se observaron mediante el microscopio óptico utilizando el objetivo de 100 aumentos y usando aceite de inmersión.

Se contaron 200 leucocitos en cada extensión sanguínea, en diferentes áreas, en dirección de la cola a la cabeza del frotis y en forma de vaivén (muralla almenada), obteniéndose seguidamente los porcentajes de cada tipo celular. Es importante examinar todas las áreas de la extensión sanguínea para obtener una muestra representativa de los leucocitos. Las células grandes, como los monocitos y los heterófilos, con frecuencia se encuentran en los márgenes de los frotis, pudiendo ser fácilmente subestimados si no se observan todas las áreas de las preparaciones (Wilkinson, 2004).

#### **2.1.4. Estimación del número de trombocitos**

Realmente no existe un método fiable para realizar recuentos directos de trombocitos. No obstante, se puede hacer una estimación del número de trombocitos presentes en la sangre de cada tortuga. Para ello, elegimos un campo al azar en el frotis sanguíneo, donde no haya trombocitos agregados, y contamos el número de trombocitos presentes en dicho campo multiplicando este valor por el cuadrado del objetivo empleado; obteniendo así la estimación del número de trombocitos por  $\mu\text{l}$  de sangre (Barrows et al., 2004; Casal and Orós, 2009; Raskin, 2000; Wilkinson, 2004).

### **2.2. Análisis bioquímicos**

Para la determinación de los valores bioquímicos empleamos un analizador automático de química seca (Olympus AU640, Japan). Los valores bioquímicos sanguíneos estudiados fueron los siguientes: proteínas totales, albúmina, globulina, triglicéridos, ácido úrico, glucosa, colesterol total, urea, bilirrubina total, creatinina, lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP),  $\gamma$ -glutamil transferasa (GGT), creatina fosfoquinasa (CPK), amilasa, lipasa, calcio, cloro, sodio, potasio, fósforo y magnesio. Constituyen parámetros sanguíneos frecuentemente usados en las tortugas marinas (Aguirre, 1996). El valor aproximado de la globulina se calculó a través de la resta entre la albúmina a las proteínas totales.

## 3. Análisis toxicológicos

### 3.1. Generalidades

Cuando se quiere hacer un análisis de contaminantes en matrices complejas como son las muestras de plasma objetivo de esta tesis, es imprescindible realizar un trabajo previo de extracción de dichos analitos de la matriz en la que están contenidos, o bien, de digestión de la muestra en el caso de análisis de contaminantes inorgánicos. Son diversas las técnicas que pueden emplearse para ello.

Los principales aspectos que se deben considerar en la extracción de COPs desde el plasma son, permitir un tiempo apropiado de exposición del sistema disolvente en la matriz de muestras y limitar la manipulación de las muestras. La contaminación cruzada por residuos dejados por altos niveles de contaminantes procedentes de otras muestras previamente analizadas pueden constituir un problema en esta fase de extracción y todos los equipos y el material deben limpiarse exhaustivamente y verificarse después de cada lote de muestras, usando los blancos y controles adecuados.

128

Por este mismo motivo la pureza de los disolventes y reactivos utilizados en todo el proceso analítico también es un aspecto importante. Sólo se deben utilizar disolventes de alta pureza destilados, utilizar material de vidrio sometido a un procedimiento previo de limpieza con disolvente y además aplicarse estándares internos a la muestra tan pronto como sea posible en el proceso.

Una vez obtenidos los extractos procedentes de matrices complejas, para el análisis de COPs habitualmente es necesario proceder a una purificación de los mismos, y eliminar así los restos de grasas principalmente, ya que las impurezas disminuyen de forma muy relevante la sensibilidad de los métodos de detección empleados. Por último, antes del análisis, los extractos purificados obtenidos deben ser concentrados ya que en el proceso se han utilizado distintos volúmenes de disolventes que han ido diluyendo la muestra. Por lo tanto el uso de concentradores a base de gas inerte se hace imprescindible en la preparación final de las muestras que van a someterse al análisis instrumental.

Como veremos en las siguientes secciones de este apartado de Material y Métodos, en esta Tesis Doctoral hemos utilizado una combinación de todas estas técnicas en las diferentes etapas del proceso analítico, siguiendo los métodos oficiales de análisis de la UE elaboradas por el Comité Europeo de Normalización.

## 3.2. Material, reactivos e instrumental

### 3.2.1. Reactivos

Para el análisis de contaminantes en matrices biológicas sólo se pueden utilizar reactivos de máxima pureza (calidad "Para análisis de residuos" (PAR) o similar) y únicamente agua destilada y desmineralizada. Los reactivos que hemos utilizado en la elaboración de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

**Solventes orgánicos:** Todos los solventes Panreac empleados disponen de un certificado de registro de calidad de acuerdo con la norma ISO 9002.

- Acetonitrilo Panreac, grado PAR. Pureza 99.8%.
- Ciclohexano Panreac, grado PAR. Pureza 99.8%.
- n-Hexano Panreac, grado PAR. Pureza 95%.
- Metanol Panreac, grado PAR. Pureza 99.9%.

**Agua destilada ultrapura MilliQ**, recogida directamente en botella de vidrio.

**Suero fetal bovino** (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.)

129

**Columnas de extracción en fase sólida (SPE) Chromabond C18ec/3 ml/200 mg Macherey-Nagel.**

**Patrones de los POCs, PCBs y PAHs investigados:**

- Patrones en estado sólido
  - HCB (hexaclorobenceno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.6% de pureza.
  - $\alpha$ -HCH (isómero  $\alpha$  del 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.5% de pureza.
  - $\beta$ -HCH (isómero  $\beta$  del 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.6% de pureza.
  - $\gamma$ -HCH (isómero  $\gamma$  del 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano o lindano) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.7% de pureza.
  - $\delta$ -HCH (isómero  $\delta$  del 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.6% de pureza.
  - Aldrina (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4:5,8-dimetanonaftaleno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.6% de pureza.
  - Dieldrina (1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-endo,endo-1,4:5,8-dimetanonaftaleno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 98.1% de pureza.
  - Endrina (1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-endo,endo-1,4:5,8-dimetanonaftaleno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.4% de pureza.
  - Heptacloro (1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindeno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 98.1% de pureza.

- cis-Heptacloro epóxido (isómero cis del 2,3,4,5,6,7,7-heptacloro-1A,1B,5,5A,6,6A-hexahidro-2,5-metano-2H-indeno (1,2-b) oxireno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer del 99.8% de pureza.
- $\alpha$ -Endosulfán (isómero  $\alpha$  del 1,2,3,4,7,7-hexaclorobiciclo [2.2.1]-2-hepteno-5,6-bioximetileno sulfito) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 98.1% de pureza.
- $\beta$ -Endosulfán (isómero  $\beta$  del 1,2,3,4,7,7-hexaclorobiciclo [2.2.1]-2-hepteno-5,6-bioximetileno sulfito) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 98.8% de pureza.
- cis-clordano (isómero cis del 1,2,4,5,6,7,8,8-octacloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H-indeno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.9% de pureza.
- trans-clordano (isómero trans del 1,2,4,5,6,7,8,8-octacloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H-indeno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.9% de pureza.
- 4,4'-DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-metoxifenil)etano) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.5% de pureza.
- 4,4'-DDE (1,1-dicloro-2,2-bis (p-metoxifenil)etano) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.5% de pureza.
- 4,4'-DDD (1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil)etano) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.5% de pureza.
- PCB 202 (2,2',3,3',5,5',6,6'-octaclorobifenilo) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.5% de pureza.
- Tetracloroxileno (2,4,5,6-tetracloro-m-xileno) de Laboratorio Dr. Ehrenstorfer, del 99.5% de pureza.

### Patrones en disolución

- PCB 28 (2,4,4'-triclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 52 (2,2',5,5'-tetraclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 77 (3,3',4,4'-tetraclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 81 (3,4,4',5-tetraclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentaclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 105 (2,3,3',4,4'-pentaclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 114 (2,3,4,4',5-pentaclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 118 (2,3',4,4',5-pentaclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).
- PCB 123 (2',3,4,4',5-pentaclorobifenilo) de Absolute Standards (100  $\mu\text{g/mL}$  en isooctano).

- PCB 126 (3,3',4,4',5-pentaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 156 (2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 157 (2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 167 (2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 169 (3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 180 (2,3,4,5,2',4',5'-heptaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5'-heptaclorobifenilo) de Absolute Standards (100 µg/mL en isooctano).
- Naftaleno (biciclo[4.4.0]deca-1,3,5,7,9-penteno)de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Acenafteno (1,2-Dihidroacenaftileno) de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Acenaftileno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Antraceno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Fenantreno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Fluoreno (9H-Fluoreno) de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Fluoranteno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Criseno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Pireno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Benzo [a] antraceno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Benzo [b] fluoranteno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Benzo [k] fluoranteno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Benzo [a] pireno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Dibenzo [a,h] antraceno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Indeno [1,2,3-c,d] pireno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).
- Benzo [g,h,i] perileno de Absolute Standards (100 µg/mL en ciclohexano).

### **Patrones de los elementos inorgánicos investigados:**

Solución estándar multi-elemento a 1000 mg/l, Std. 3 Perkin Elmer pure plus conteniendo todos los elementos incluidos en el estudio.

**Material certificado de referencia** para la investigación de metales pesados (NIST SRM 1846) del National Institute of Standards, Gaithersburg, EE.UU.

Los solventes orgánicos y reactivos utilizados a lo largo de este estudio han sido sometidos a **PRUEBAS DE PUREZA** con el objetivo de comprobar si estaban exentos de impurezas que pudieran interferir en el posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), tal y como se detalla a continuación:

**Solventes orgánicos:** se ha seguido el criterio de la norma UNE-EN 1528-1 para la determinación de contaminantes orgánicos (AENOR, 1997) para evaluar la pureza de los solventes orgánicos utilizados en el presente estudio. Para ello se han concentrado 110 veces que supera en 20 veces es el valor máximo alcanzado en cualquiera de los métodos analíticos empleados. Posteriormente los concentrados se analizaron mediante GC-MS y se comprobó la ausencia de los espectros de masas de los analitos incluidos en el estudio a los tiempos de retención correspondientes a los mismos.

**Agua destilada MilliQ:** el agua destilada utilizada en el presente estudio fue lavada con n-hexano (150 ml de n-hexano/l de agua) para eliminar impurezas que pudieran interferir en los resultados. Su pureza se ha comprobado analizando por GC-MS el extracto orgánico concentrado 40 veces, procedente de agitar 15 ml de agua y 20 ml de n-hexano en embudo de decantación durante 2 minutos.

### **3.2.2. Material**

- Filtros de disco de 0.22  $\mu\text{m}$  Chromafil (Macherey-Nagel, Alemania)
- Vasos de precipitado de vidrio de diferentes volúmenes (50, 100 y 200 ml).
- Matraces aforados de vidrio de diferentes volúmenes (10, 50, 100, 250, 500 y 1,000 ml).
- Probetas graduadas de vidrio, sin tapón y con tapón de cierre esmerilado, de diferentes volúmenes (10, 50, 100, 200, 500 ml).
- Embudos de vidrio de 75 mm de diámetro.
- Tubos de ensayo de vidrio de 15 ml de capacidad.
- Viales de vidrio de 20 ml de capacidad provistos de septum recubierto de teflón y cápsula de cierre hermético de aluminio.
- Viales de vidrio de 1.8 ml de capacidad, provistos de tapón roscado con septum recubierto de teflón Supelco, para utilizar con inyector automático de cromatógrafos de gases.

- Viales de vidrio con inserto de 200  $\mu\text{l}$  de capacidad, para utilizar con inyector automático de cromatógrafos de gases de Supelco.
- Pipetas Pasteur de vidrio.
- Imanes para agitador magnético recubiertos de teflón de diferentes tamaños de Sigma-Aldrich.
- Microjeringas de vidrio de 10  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$ , SGE Analytical Science

Sin duda es obvia la importancia de la **LIMPIEZA DEL MATERIAL** para evitar cualquier interferencia en la determinación cromatográfica de los analitos. Por este motivo, todo el material de preparación de muestras fue lavado con agua y detergente, enjuagado con agua destilada y secado en estufa a  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ , y finalmente se lavó 3 veces con n-hexano.

La ausencia de picos interferentes con los analitos se comprobó inyectando el n-hexano puesto en contacto con el material previamente lavado como se describe arriba.

### 3.2.3. Aparatos auxiliares

- Balanza de precisión, de 1 mg a 210 g, con una desviación máxima de 0.1 mg. A & D Instruments Ltd.
- Vitrina de aspiración y filtración de gases Cruma 1010 G/GS.
- Centrífuga portátil de sobremesa modelo 5702R (Eppendorf, EE.UU.)
- Sistema de vacío (vacuum manifold, Waters Corporation, USA).
- Unidad de mineralización de muestras bajo presión (hasta 30 bar) asistida por microondas Milestone modelo MLS 1200 mega de 10 posiciones (vasos de teflón), equipada con módulo de gases Milestone EM-45/A y controlador digital Milestone mega 240.
- Estación de concentración por corriente de nitrógeno Techne Simple Concentrator equipada con calefactor de tubos Techne Dry-block DB-3.
- Sistema de generación de nitrógeno Clan Tecnológica Zefiro 35 LC-MS con capacidad para generar 35 l de nitrógeno por minuto.
- Estufa de convección natural Selecta DigitHeat 80L.
- Ultrasonidos Ultrasons Selecta de 2.8 l de capacidad y ondas sonoras de alta frecuencia (40 KHz).
- Baño de agua con control digital de 5 l de capacidad. Selecta.
- Agitador magnetic Ovan Multimix D9P.
- Agitador orbital Cole-Parmer Torque de 20 posiciones.
- Agitador de balanceo Selecta Movil-Tub de 15 posiciones.
- Agitadores vortex Selecta.
- Micropipetas Eppendorf (2-20  $\mu\text{l}$ , 20-100  $\mu\text{l}$ , 20-200  $\mu\text{l}$ , 100-1,000  $\mu\text{l}$  y 200-5,000  $\mu\text{l}$ ).

### 3.2.4. Instrumentación analítica y accesorios

**SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO (GC-QqQ-MS)** formado por los siguientes equipos y accesorios:

- Cromatógrafo de gases Thermo Finnigan, modelo TRACE GC ULTRA, equipado con inyector split/splitless.
- Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Thermo Finnigan, modelo Quantum XLS.
- Inyector automático Thermo Finnigan, modelo TriPlus SL/SSL con bandeja de 105 posiciones.
- Microjeringa para inyector automático de 10 µl.
- Columna cromatográfica capilar de sílice fundida con fase estacionaria de 5% fenil metil silicona, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película (BPX5, SGE Analytical Science).
- Estación de trabajo DELL, dotada de software Xcalibur (Ver. 2.0.1) para el control, la adquisición y análisis de los datos. Este software cuenta con una librería de transiciones generadas por impacto electrónico a 70 eV en modo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) especialmente creada en nuestro laboratorio para los analitos objeto de esta Tesis.
- Gas portador Helio BIP del 99.9995% de pureza mínima, suministrado por Carburos Metálicos, con la certificación ISO 9002 concedida por AENOR (Asociación Española de Normalización).
- Gas de colisión Argón X50S del 99.9995% de pureza mínima, suministrado por Carburos Metálicos, con la certificación ISO 9002 concedida por AENOR.
- Filtro de purificación de gases de cromatografía con alta capacidad para el atrapamiento de humedad, oxígeno e hidrocarburos, con indicador de capacidad, SGE analytical Science.
- Liners, septums, férrulas, tuercas, uniones y resto de material de cromatografía de gases de SGE Analytical Science.

**SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ÓPTICA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-OES)** formado por los siguientes equipos y accesorios:

- Espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente Perkin Elmer modelo Optima 2100 DV con configuraciones axial (AX-ICP-OES) y radial (RD-ICP-OX) equipado con una red de difracción de 79 líneas/nm, un detector de estado sólido y una antorcha de plasma con una inyección de 2 mm de diámetro interno.
- Fuente de radiofrecuencia de 40 MHz que proporciona una energía de 0.75-1.5 kW.



- Sistema de vaporización de la muestra mediante ultrasonidos CETAC Ultrasonic Nebulizer y cámara de vaporización U5000AT+.
- Inyector automático Perkin Elmer modelo 90.
- Gas de vaporización Argón X50S del 99.9995% de pureza mínima, suministrado por Carburos Metálicos, con la certificación ISO 9002 concedida por AENOR.

### **3.3. Procedimientos**

#### **3.3.1. Preparación de patrones y materiales de referencia**

##### **3.3.1.1. Preparación de soluciones de fortificación de los COPs**

Para la elaboración de las soluciones patrón que iban a ser adicionadas a las muestras de plasma para la determinación de los porcentajes de recuperación, se eligió acetona en base a dos factores: su solubilidad y miscibilidad tanto en matrices con un alto contenido en agua como con los solventes apolares (n-hexano, tolueno y diclorometano) en los que están preparados las soluciones madre. Un factor negativo que podría haber hecho que se desechara su elección es la capacidad de la acetona, al igual que el acetonitrilo, para provocar un precipitado de proteínas cuando se añaden al plasma. Sin embargo, se comprobó previamente que el volumen de solvente adicionado no producía un cambio físico apreciable en la matriz investigada.

135

Las soluciones madre de 1 ó 0.1 mg/ml de solución de los patrones estándar sólidos se han realizado en n-hexano, solvente recomendado por la USEPA para la elaboración de soluciones patrón, excepto en el caso del  $\beta$ -HCH donde, por razones de solubilidad, se ha elegido diclorometano para conseguir la completa disolución del patrón puro. A partir de ellas se prepararon las soluciones de trabajo para añadir al plasma, tal y como se comentó anteriormente.

Se prepararon dos soluciones de trabajo de 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en acetona para la fortificación del plasma, a partir de las soluciones madre de cada contaminante individual a 1 ó 0.1 mg/ml en n-hexano, ciclohexano, diclorometano o isooctano.

Se preparó una solución de trabajo a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en acetona para su utilización como estándar interno, conteniendo cis heptacloro epóxido, 3,4,5,6 tetracloro-m-xileno y PCB 202, a partir de las soluciones madre de cada estándar interno a 1 mg/ml en ciclohexano o isooctano.

##### **3.3.1.2. Fortificación con COPs de muestras de plasma**

Según las recomendaciones de la Guía para el plan de vigilancia mundial de COPs (PNUMA 2007) la determinación de los porcentajes de recuperación de las técnicas de extracción empleadas debería ser determinada, preferentemente, mediante la adición de los analitos objeto de estudio a una muestra similar a la estudiada y exenta de concentraciones por encima del nivel de detección de los analitos investigados.

Por consiguiente en primer lugar se analizó cualitativamente el material de referencia, que consistió en suero fetal bovino, por los métodos descritos más adelante con el objetivo de encontrar una muestra suero exenta de contaminación natural por residuos de COPs.

Las muestras de suero seleccionadas fueron fortificadas a las concentraciones de 10 ng/ml y 100 ng/ml para el estudio del porcentaje de recuperación de cada analito con la técnica de extracción empleada. Para fortificar se añadió una alícuota de 10 µl de la solución de fortificación a 1 µg/ml a 1 ml de suero para el punto de 10 ng/ml y 10 µl de la solución de fortificación a 10 µg/ml para el punto de 100 ng/ml. A cada muestra de suero se le añadió también 10 µl de la mezcla de estándares internos a 10 µg/ml en acetona.

Paralelamente y siguiendo el mismo procedimiento, se preparó una solución patrón en n-hexano a las mismas concentraciones de fortificación del suero, 10 ng/ml y 100 ng/ml, que se utilizaron para calcular el porcentaje de recuperación, por comparación de la concentración de los analitos en la solución patrón y en el extracto final procedente de la muestra de suero sometida al método de análisis descrito más adelante.

Antes de la extracción, las muestras de suero fortificadas se homogenizaron durante 2 horas en un agitador automático a 400 oscilaciones por minuto y transcurrido ese tiempo se mantuvieron en refrigeración durante la noche para permitir una buena distribución de los compuestos de interés en la fracción grasa del suero e imitar a las muestras con contaminación natural (Schenck and Wagner, 1995).

### **3.3.1.3. Preparación de rectas de calibrado de COPs**

Según las recomendaciones de la Guía para el plan de vigilancia mundial de COPs (PNUMA 2007) la elaboración de las rectas de calibrado para la cuantificación en contaminantes debería hacerse a partir de la contaminación de la matriz de interés a cada una de las concentraciones de calibración y sometiendo las muestras así contaminadas al mismo procedimiento de extracción y purificación que las muestras objeto de estudio.

De forma similar a la descrita en el apartado anterior y partiendo de alícuotas de las mismas muestras de suero de referencia, se procedió a su contaminación con la mezcla de COPs en acetona para conseguir 7 concentraciones que se usarían en la recta de calibrado, desde 0.1 ng/ml hasta 50 ng/ml de los 52 analitos incluidos en esta tesis doctoral igualmente se añadió cada una de estas alícuotas un volumen de 10 µl de la mezcla de estándares internos a 10 µg/ml en acetona.

Al igual que en el apartado de fortificación de las muestras de suero para determinar los porcentajes de recuperación, en este caso, antes de la extracción, las

muestras de suero fortificadas se homogenizaron durante 2 horas en un agitador automático a 400 oscilaciones por minuto y se mantuvieron en refrigeración durante la noche para permitir una buena distribución de los compuestos de interés en la fracción grasa del suero e imitar a las muestras con contaminación natural (Schenck and Wagner, 1995).

Tras esto, se procedió a la extracción de cada una de las alícuotas por el procedimiento descrito más adelante. Los extractos obtenidos se alícuotearon en viales de cromatografía con inserto y se guardaron congelados a -20°C para su uso durante todos los análisis de COPs de esta Tesis Doctoral.

La linealidad de las curvas de calibrado fue evaluada en el rango de las 7 concentraciones que se usaron en dicha curva (desde 0.1 ng/ml hasta 50 ng/ml). Los cálculos se hicieron a partir de las áreas de cada analito y sin tener en cuenta el punto de origen. La exactitud y precisión del método fueron evaluadas utilizando suero libre de contaminantes de interferencia que a su vez fue fortificado con los 57 analitos estudiados en esta Tesis Doctoral para los estudios de recuperación. Los resultados fueron determinados a partir de 10 replicados fortificados a dos concentraciones distintas (10 y 100 ng/ml). Se calculó la recuperación y la desviación estándar relativa para cada nivel de fortificación. El límite de detección (LOD) se calculó como tres veces la desviación estándar de los valores absolutos en el nivel más bajo de calibración y el límite de cuantificación (LOQ) se calculó como 3.3 veces sobre el límite de detección.

#### **3.3.1.4. Preparación de rectas de calibrado de CIPs**

Se utilizó como solución madre un estándar multi-elemento 1000 mg/l (Std. 3, PerkinElmer Pure Plus) que contiene todos los elementos estudiados. Todas las soluciones patrones para las rectas de calibrado entre 2 ng/ml y 7 ng/ml se prepararon a partir de ella por simple dilución con agua ultrapura Milli-Q. Las rectas de calibrado se prepararon a diario.

### **3.3.2. Preparación de las muestras**

#### **3.3.2.1. Preparación de las muestras de plasma para el análisis de COPs**

Para la extracción de POCs, PCBs y PAHs en plasma se utilizó el método de **extracción de fase sólida** descrito utilizando cartuchos de extracción de C18 de Chromabond (Macherey Nagel, Alemania).

Antes de la aplicación de la muestra, los cartuchos fueron acondicionados con 3 ml de metanol y 3 ml de n-propanol bajo vacío a un flujo de 1.5 ml/min. A continuación, las muestras se pasaron a través de la columna mediante gravedad y tras esto, la columna fue lavada con 3 ml de n-propanol. Después la columna fue secada mediante vacío durante 30 minutos. Los analitos de interés fueron eluidos

de la columna con 2 x 2 ml de hexano. Esta fracción se evaporó a sequedad bajo corriente suave de nitrógeno y el residuo se disolvió con 200 µl de ciclohexano que se transfirieron a viales de cromatografía con inserto para pequeños volúmenes para su utilización en el análisis por GC-MS.

### 3.3.2.2. Preparación de muestras de sangre para el análisis de CIPs

Se transfirieron 0.8 mg de sangre entera a los vasos de Teflón® de la unidad de **mineralización de muestras** bajo presión asistida por microondas. Se añadieron también 6 ml de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>). El horno se programó en 3 etapas alcanzando una temperatura máxima de 230°C durante 46 minutos y finalmente 10 minutos de venteo.

Tras refrigerar los viales digeridos durante 30 minutos en baño de agua a temperatura ambiente, el líquido transparente, inodoro, incoloro y homogéneo que se obtuvo fue diluido 1:50 v/v con agua desionizada MilliQ.

El material certificado de referencia (BCR-422) fue igualmente digerido en el horno microondas usando el mismo procedimiento descrito para las muestras.

### 3.3.3. Análisis químico

#### 3.3.3.1. Análisis de COPs

Los análisis cromatográficos para la determinación de COPs fueron realizados en un cromatógrafo de gases Trace Ultra GC equipado con inyector split/splitless, acoplado en tándem a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum XLS (Thermo-Fisher Scientific, EE.UU.), tal y como ha sido previamente descrito (Camacho et al., 2012).

Para la separación cromatográfica se usó como fase estacionaria una columna capilar BPX5 (5% fenil metilpolisiloxano) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y un espesor de fase de 0.25 µm. Como fase móvil se usó helio a un flujo de 1 ml/min.

Las temperaturas del horno del cromatógrafo se programaron de la siguiente manera: inicialmente la temperatura del horno fue fijada a 60°C y mantenida durante 1 min, seguido de un incremento de 15°C/min hasta alcanzar los 160°C. Tras esto, la temperatura se aumentó hasta 230°C a 2.3°C por minuto y se mantuvo a 230°C durante 1 minuto y finalmente, la temperatura fue aumentada a 5°C por minuto hasta alcanzar los 290°C, temperatura que se mantuvo durante 7.9 minutos. En total cada carrera cromatográfica duró 60 minutos y en ese momento, las compuertas traseras del cromatógrafo se abrieron para permitir que el ventilador trabajara enfriando la cámara y alcanzar nuevamente los 60°C, dejándolo preparado para un nuevo análisis. La temperatura del puerto de

inyección split/splitless se programó a 240°C con el fin de facilitar la volatilización de todos los analitos objeto de estudio, incluidos aquellos con mayor número de átomos de cloro en su estructura. La temperatura de la línea de transferencia (conecta el cromatógrafo con el espectrómetro de masas) se programó a 290°C.

El Helio (99.999%) se utilizó como gas portador a un flujo constante de 1 mL por minuto, mientras que el argón (99.999%) se utilizó como gas de colisión a una presión de 1.2 mTorr. El espectrómetro de masas se programó para que realizara la adquisición de datos en el modo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) en modo electrospray a 70 eV, con una emisión de corriente de 50  $\mu$ A. La temperatura de la fuente de ionización fue fijada a 220°C. Se fijó un retraso del encendido del filamento de 5 minutos para prevenir su deterioro. El voltaje del multiplicador fue fijado en 1,640 V.

Para el estudio de los tiempos de retención, la selección de los iones a monitorizar y las abundancias relativas de cada compuesto de interés se hizo un estudio previo con patrones certificados individuales de cada analito. Los patrones se inyectaron en el cromatógrafo de forma individual bajo las mismas condiciones cromatográficas que se usarían posteriormente en el análisis de muestras y en el mismo modo de ionización, con el fin de determinar cuáles eran las condiciones óptimas de sensibilidad para cada uno de ellos. De esta manera se inyectó 1  $\mu$ l de una solución preparada a 1  $\mu$ g/ml en ciclohexano de cada analito o estándar interno utilizado en este estudio.

De este estudio previo se seleccionaron los iones padre que fueron sometidos a fragmentación en el Q2 a diferentes voltajes con ayuda del software para espectrometría de masas de Thermo Finnigan Xcalibur v2.0. Se estudió el patrón de fragmentación de cada ión padre seleccionado y se eligieron los dos iones resultantes y se creó una librería de transiciones que permitió programar el espectrómetro de masas para trabajar en modo de SRM. Para cada uno de los analitos se eligieron al menos 2 transiciones SRM.

En las **Tabla 4 y 5** se muestra el resumen de los datos espectrométricos de cada uno de los COPs y estándares internos incluidos en este estudio.

**Tabla 4.** Nombre del compuesto, tiempo de retención (tR), ión precursor, iones de fragmentación, energía de colisión en Q2 (entre paréntesis) y número de puntos de identificación (IPs) de todos los COPs y estándares internos incluidos en el estudio.

Name	t <sub>R</sub> /min	ión precursor (m/z)	Ions producto, m/z (collision energy/eV)	IPs
<b>Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)</b>				
<i>Naftaleno</i>	7.20	128	103 (15), 78 (15)	4
<i>Acenaftileno</i>	10.63	152	151 (10), 126 (10)	4
<i>Acenafteno</i>	11.08	154	153 (10), 152 (10)	4
<i>Fluoreno</i>	13.05	166	165 (15), 163 (15)	4
<i>Antraceno</i>	18.22	178	176 (30), 152 (30)	4
<i>Fenantreno</i>	18.73	178	176 (30), 152 (30)	4
<i>Fluoranteno</i>	27.24	202	201 (10), 200 (10)	4
<i>Pireno</i>	29.11	202	201 (10), 200 (10)	4
<i>Benzo [a] antraceno</i>	40.64	228	226 (20), 202 (20)	4
<i>Criseno</i>	40.95	228	226 (20), 202 (20)	4
<i>Benzo [b] fluoranteno</i>	48.37	252	250 (30), 226 (30)	4
<i>Benzo [k] fluoranteno</i>	48.54	252	250 (30), 226 (30)	4
<i>Benzo [a] pireno</i>	50.10	252	250 (30), 226 (30)	4
<i>Indeno [1,2,3-c,d] pireno</i>	55.63	276	274 (35), 250 (35)	4
<i>Dibenzo [a,h] antraceno</i>	55.91	278	276 (35), 226 (35)	4
<i>Benzo [g,h,i] perileno</i>	57.12	276	274 (35), 250 (35)	4
<b>Plaguicidas organoclorados (POCs)</b>				
<i>Hexaclorociclohexano (alfa)</i>	15.49	216.0	181 (15), 183 (15)	4
<i>Hexaclorobenceno</i>	15.56	284	214 (20), 249 (20)	4
<i>Hexaclorociclohexano (gamma)</i>	17.16	217, 219	181 (15), 183 (15)	5
<i>Hexaclorociclohexano (beta)</i>	17.25	217	181 (15), 183 (15)	4
<i>Hexaclorociclohexano (delta)</i>	19.30	217	181 (15), 183 (15)	4
<i>Heptacloro</i>	21.36	258, 339	186 (22), 304 (15)	5
<i>Aldrin</i>	23.60	263	193 (32), 228 (26)	4
<i>Clordano (trans)</i>	28.04	373, 375	266 (15), 268 (17)	5
<i>2,4-DDE</i>	28.38	318	246 (20), 248 (20)	4
<i>Endosulfan (alfa)</i>	28.88	196	159 (17), 161 (15)	4
<i>Clordano (cis)</i>	28.95	373, 410	266 (18), 375 (5)	5
<i>4,4'-DDE</i>	30.82	318	246 (20), 248 (20)	4
<i>Dieldrin</i>	30.90	277	207 (20), 241 (10)	4
<i>2,4-DDD</i>	31.31	235	165 (20), 199 (18)	4
<i>Endrin</i>	32.42	263	191 (25), 193 (27)	4
<i>Endosulfan (beta)</i>	33.50	196	159 (16), 160 (15)	4
<i>4,4'-DDD</i>	33.93	235	165 (20), 199 (18)	4
<i>2,4-DDT</i>	34.02	235	165 (15), 199 (15)	4
<i>Endosulfan sulfate</i>	36.38	274	237 (10), 239 (15)	4
<i>4,4'-DDT</i>	36.77	235	165 (20), 199 (15)	4
<i>Metoxicloro</i>	41.32	274	239 (20), 259 (20)	4
<i>Mirex</i>	43.82	270, 272	235 (15), 237 (15)	5

Name	t <sub>R</sub> /min	Ión precursor (m/z)	Ions producto, m/z (collision energy/eV)	IPs
<b>Bifenilos policlorados (PCBs)</b>				
PCB 28	20.63	256, 258	186 (22), 186 (42)	5
PCB 52	22.79	290, 292	220 (22), 220(20)	5
PCB 101	28.67	324, 326	254 (20), 256 (25)	5
PCB 81	30.74	290, 292	220 (22), 220 (20)	5
PCB 77	31.52	290, 292	220 (22), 220 (20)	5
PCB 123	32.91	324, 326	254 (20), 256 (25)	5
PCB 118	33.22	324, 326	254 (20), 256 (25)	5
PCB 114	33.93	324, 326	254 (20), 256 (25)	5
PCB 153	34.72	358, 360	288 (30), 290 (22)	5
PCB 105	35.06	324, 326	254 (20), 256 (25)	5
PCB 138	36.88	358, 360	288 (30), 290 (22)	5
PCB 126	37.61	324, 326	254 (20), 256 (25)	5
PCB 167	38.91	358, 360	288 (30), 290 (22)	5
PCB 156	40.60	358, 360	288 (30), 290 (22)	5
PCB 157	40.95	358, 360	288 (30), 290 (22)	5
PCB 180	41.69	392, 394	322 (30), 324 (20)	5
PCB 169	43.23	358, 360	288 (30), 290 (22)	5
PCB 189	45.24	392, 394	322 (30), 324 (20)	5

La Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC (2002) introdujo el concepto de Puntos de Identificación (IPs) en la etapa de confirmación de resultados por espectrometría de masas. La confirmación de la identidad de los analitos incluidos en este trabajo implicó la monitorización de dos iones de fragmentación procedentes del mismo ión precursor, lo cual supone que se usan 4 IPs; o bien dos iones de fragmentación procedentes de iones precursores diferentes, lo cual resulta en 5 IPs. En ambos casos la metodología empleada satisface los requerimientos establecidos en la citada Decisión de la Comisión Europea. Los IPs resultantes para cada uno de los analitos están reflejados en la **Tabla 4**.

**Tabla 5.** Nombre del compuesto, límite de cuantificación (LOQ), rango de linealidad y coeficiente de regresión ( $r^2$ ) de todos los COPs y estándares internos incluidos en el estudio.

Compuesto	LOQ (ng/ml)	Rango lineal (ng/ml)	$r^2$
Tetracloro xileno (IS)	NA	NA	NA
$\alpha$ -Hexaclorociclohexano	0.001	0.001 – 20	0.999
Hexaclorobenceno	0.001	0.001 – 20	1.000
$\beta$ -Hexaclorociclohexano	0.001	0.001 – 20	0.999
$\gamma$ -Hexaclorociclohexano	0.001	0.001 – 20	0.998
$\delta$ -Hexaclorociclohexano	0.001	0.001 – 20	0.999
PCB 28	0.01	0.01 – 20	0.994
Heptacloro	0.001	0.001 – 20	0.997
PCB 52	0.01	0.01 – 20	0.974
Aldrina	0.001	0.001 – 20	0.998
<i>trans</i> -clordano	0.01	0.01 – 20	0.998
PCB 101	0.001	0.001 – 20	0.991
<i>cis</i> -clordano	0.001	0.001 – 20	0.995
$\alpha$ -endosulfán	0.01	0.01 – 20	0.999
4,4'-DDE	0.001	0.001 – 20	0.994
PCB 81	0.001	0.001 – 20	0.995
PCB 77	0.001	0.001 – 20	1.000
4,4'-DDD	0.01	0.01 – 20	0.987
<i>cis</i> -Heptacloro epóxido (IS)	NA	NA	NA
Endrina	0.01	0.01 – 20	0.999
PCB 118	0.01	0.01 – 20	0.999
PCB 123	0.001	0.001 – 20	0.974
$\beta$ -endosulfán	0.001	0.001 – 20	0.994
PCB 114	0.001	0.001 – 20	0.989
PCB 153	0.005	0.005 – 20	0.999
PCB 105	0.001	0.001 – 20	0.991
4,4'-DDT	0.01	0.01 – 20	0.999
PCB 138	0.01	0.01 – 20	0.997
PCB 126	0.001	0.001 – 20	0.983
PCB 167	0.001	0.001 – 20	1.000
PCB 202 (IS)	NA	NA	NA
Metoxicloro	0.01	0.01 – 20	0.995
PCB 156	0.001	0.001 – 20	0.956
PCB 157	0.001	0.001 – 20	0.992
PCB 180	0.005	0.005 – 20	1.000
PCB 169	0.001	0.001 – 20	0.965
PCB 189	0.001	0.001 – 20	1.000



Consideramos como límite de cuantificación (LOQ) un valor 3.3 veces superior al límite de detección (LOD) de cada analito. Como se muestra en la **Tabla 4** el LOQ fue de 0.01 ng/ml para el 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, metoxicloro y PCBs 28, 52, 101, 118 y 138; de 0.005 ng/ml para los PCBs 153 y 180 y todos los PAHs; y de 0.001 ng/ml para el resto de los analitos.

La cuantificación se basó en el factor resultante de dividir el área del analito entre el área del estándar interno y se realizó frente a una recta de calibrado de 7 puntos en ciclohexano. Para la cuantificación se usó el programa LCQuan versión 2.0 de ThermoFisher Scientific Corporation (San José, EE.UU.) (**Figura 4**).

En este trabajo expresamos los resultados de los contaminantes de forma individual, y también como sumatorios. Así, denominamos:

- Sumatorio de DDTs ( $\Sigma$ DDTs) a la suma de las concentraciones de 4,4'-DDT, 4,4'-DDE y 4,4'-DDD.
- Sumatorio de ciclodienos ( $\Sigma$ ciclodienos) a la suma de las concentraciones de aldrina, dieldrina, endrina, heptacloro.
- Sumatorio de hexaclorociclohexano ( $\Sigma$ HCH) a la suma de las concentraciones de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ - del hexaclorociclohexano.
- Sumatorio de endosulfán ( $\Sigma$ endosulfán) a la suma de las concentraciones de los isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ - del endosulfán.
- Sumatorio de clordano ( $\Sigma$ clordano) a la suma de las concentraciones de los isómeros cis- y trans- del clordano.
- Sumatorio de POCs ( $\Sigma$ POCs) a la suma de las concentraciones de los 17 POCs incluidos en este estudio.
- Sumatorio de marcadores de PCBs ( $\Sigma$ M-PCBs) a la suma de las concentraciones de los congéneres de PCBs nº 28, 52, 101, 118, 138, 153, y 180
- Sumatorio de PCBs análogos a las dioxinas ( $\Sigma$ DL-PCBs) a la suma de las concentraciones de los congéneres de PCBs nº 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 y 189
- Sumatorio de PCBs ( $\Sigma$ PCBs) a la suma de las concentraciones de todos los congéneres de PCBs incluidos en este estudio.
- Sumatorio de PAHs ( $\Sigma$ PAHs) a la suma de las concentraciones de todos los PAHs incluidos en este estudio.

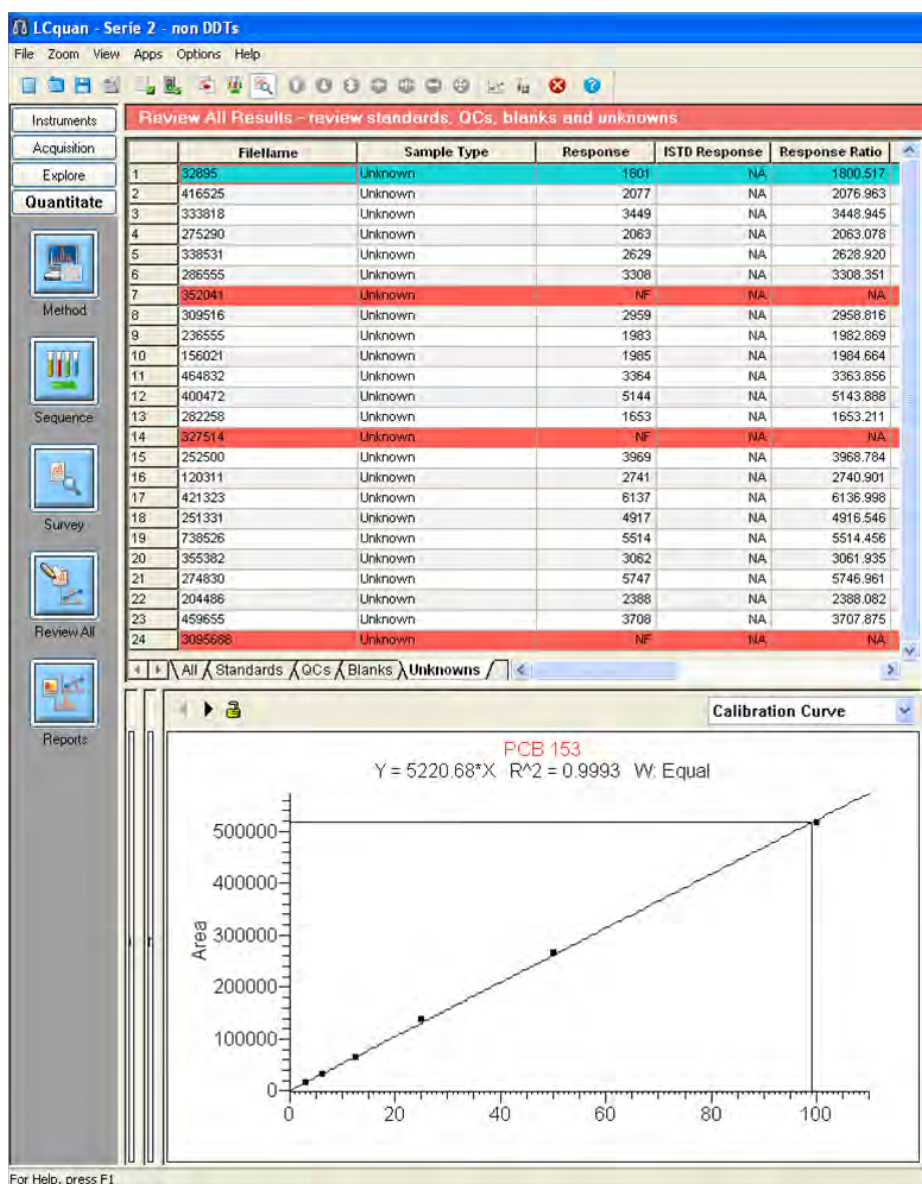


Figura 4. Pantalla del programa LCQuan 2.0 usado para la cuantificación de los analitos incluidos en este estudio.

### 3.3.3.2. Análisis de CIPs

Los análisis para la determinación de CIPs (arsénico, cadmio, cromo, cobre, manganeso, níquel, plomo, mercurio, selenio, zinc y aluminio) fueron realizados con un sistema de espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Perkin Elmer modelo Optima 2100 DV, tal y como ha sido previamente descrito (Nascimento et al., 2010).

La evaluación de la estabilidad del plasma a corto y a largo plazo se realizó con una solución de sangre digerida (1:50, v/v), que contenía 2.0 mg/l de magnesio (Mg) en HNO<sub>3</sub> al 2% (v/v). Para evaluar la estabilidad a corto plazo se realizaron 15 medidas consecutivas de la intensidad de la línea de Mg a 280.265 nm, con posterior análisis de la desviación típica relativa. Con el fin de establecer la estabilidad a largo plazo, la línea de emisión del Mg fue monitorizada durante 2 h, en el transcurso de las cuales se realizaron 8 medidas a intervalos de 15 min. Ambas pruebas se realizaron en la configuración axial del ICP-OES (AX-ICP-OES) con un caudal de gas de nebulización de 0,6 l/min y 1,3 kW de potencia aplicada, según lo sugerido por la literatura (Nascimento et al., 2010).

145

El equipo se ajustó utilizando un caudal de gas de nebulización de entre 0.3 y 1.1 l/min y una potencia desde 1,1 hasta 1,5 kW. Según se iban cambiando estos parámetros se evaluó la robustez del plasma utilizando el ratio de la señal Mg II/ Mg I como diagnóstico. El plasma se consideró estable cuando la relación Mg II/ Mg I fue superior o igual a 8.

El rango de linealidad estudiado fue de entre 2.0 y 70.0 µg/l. La curva de linealidad se obtuvo a partir de soluciones acuosas de estándares (n=3) o en sangre digerida (n=3). Se comparó la pendiente de la curva para cada elemento (coeficiente angular) obtenida en agua y en sangre digerida para evaluar la presencia de efecto matriz utilizando el test de t de Student. Las cuentas por segundo (CPS) para cada concentración fueron medidas 3 veces y se utilizó la media para representar las curvas de linealidad.

En todos los análisis se utilizó una concentración de 1 mg/ml de litio (Li) y níquel (Ni) como estándares internos. Las condiciones de operación del ICP-OES se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Condiciones de operación del ICP-OES

	<b>Valor</b>
<b>General</b>	
<i>Potencia de la radiofrecuencia (W)</i>	1300
<i>Velocidad de absorción de muestra (ml/min)</i>	1.5
<b>Flujo de gas (l/min)</b>	
<i>Plasma</i>	15.0
<i>Auxiliar</i>	0.5
<i>Nebulizador</i>	0.8
<b>Longitud de onda de detección (nm)</b>	
<i>Arsénico (As)</i>	193.695
<i>Cadmio (Cd)</i>	214.440
<i>Cromo (Cr)</i>	267.716
<i>Mercurio (Hg)</i>	253.652
<i>Plomo (Pb)</i>	220.353
<i>Cobre (Cu)</i>	324.752
<i>Manganeso (Mn)</i>	257.610
<i>Níquel (Ni)</i>	341.476
<i>Selenio (Se)</i>	196.026
<i>Zinc (Zn)</i>	206.200
<i>Aluminio (Al)</i>	396.153

## 4. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos durante esta Tesis se empleó el Programa PASW Statistics v 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Debido a que los niveles de los CTPs medidos en muestras de plasma (o sangre entera en el caso de los CIPs) no seguían una distribución normal, se expresan los datos en media y desviación estándar y en mediana, así como valores máximos y mínimos cuantificados (rango). Asimismo se muestra el porcentaje de muestra en que se detectó cada contaminante o grupo de contaminantes.

Al ser los niveles de contaminantes variables continuas que no siguen una distribución normal, en los estudios de comparación entre grupos se han empleado tests no paramétricos (U de Mann-Whitney y Kruskal Wallis). Los análisis de comparación entre grupos de variables categóricas (por ejemplo, porcentaje de detección o no detección de un contaminante) se realizaron mediante  $X^2$ . La correlación de contaminantes con variables continuas se analizó mediante el test de correlación de Spearman. Valores de p menores de 0.05 (dos colas) se consideraron como estadísticamente significativos.



# CAPÍTULO I

Metabolic and respiratory  
status of stranded juvenile  
loggerhead sea turtles (*Caretta  
caretta*): 66 cases (2008–2009)



**CAPÍTULO I**

**Metabolic and respiratory status of stranded juvenile loggerhead sea turtles**

**(*Caretta caretta*): 66 cases (2008–2009) .....** 149

ABSTRACT .....

INTRODUCTION .....

MATERIAL AND METHODS .....

RESULTS .....

DISCUSSION .....

CONCLUSIONS .....



# Metabolic and respiratory status of stranded juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): 66 cases (2008–2009)

María Camacho, DVM; María P. Quintana, DM, PhD; Octavio P. Luzardo, DVM, PhD; María D. Estévez, DVM; Pascual Calabuig, DVM, BS; Jorge Orós, DVM, PhD

**Objective**—To document venous blood gas, acid-base, and plasma biochemical values for stranded juvenile loggerhead turtles at admission to a rehabilitation facility, compare these values among stranding causes, investigate differences in these values for turtles that survived versus those that died, and establish the baseline values for successfully rehabilitated loggerhead turtles (*Caretta caretta*).

**Design**—Retrospective case series.

**Animals**—66 stranded juvenile loggerhead turtles that were hospitalized between 2008 and 2009.

**Procedures**—Venous blood gas, acid-base, and plasma biochemical values at the time of admission were compared retrospectively among turtles with different stranding causes. Initial results were compared between turtles that survived and turtles that died. Results for survivors were compared between the time of admission and time of release.

**Results**—57 (86.36%) turtles had various types of acid-base disorders at the time of admission to the rehabilitation facility. Of these, 33 (57.9%) had mixed acid-base disorders and 24 (42.1%) had primary acid-base disorders. All acid-base disorders were classified as mild to moderate, except 1 case of severe metabolic and respiratory acidosis. Except for the debilitated turtles (in which the mean initial glucose concentration was much lower than that observed for the rest of turtles), there was no difference in initial values when comparing stranding causes. Turtles that died during rehabilitation had significantly higher initial anion gap and osmolality, compared with turtles that survived.

**Conclusions and Clinical Relevance**—Acid-base disorders were present in most stranded juvenile loggerhead turtles. Evaluation of accurately obtained, temperature-corrected venous blood gas, acid-base, and plasma biochemical values can provide important clinical and prognostic information and a valuable basis for the implementation of adequate and rapid treatment for stranded loggerhead turtles admitted to rehabilitation facilities. (*J Am Vet Med Assoc* 2013;242:396–401)

Veterinary care in sea turtle rehabilitation facilities is an essential component of sea turtle conservation around the world. Clinical and pathological studies are continuing to contribute to a better understanding of problems in stranded sea turtles and provide a basis to guide conservation efforts. Five species of sea turtles have been reported around the Canary Islands: loggerhead (*Caretta caretta*), green turtle (*Chelonia mydas*), leatherback (*Dermochelys coriacea*), hawksbill (*Eretmochelys imbricata*), and olive ridley (*Lepidochelys olivacea*).<sup>1,2</sup> However, loggerhead turtles are the most common species found around the Canary Islands coming from the US western Atlantic by the Gulf Stream.<sup>1,3</sup>

From the Veterinary Faculty, University of Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontana s/n, 35416 Arucas (Las Palmas), Spain (Camacho, Luzardo, Orós); the Department of Mathematics, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain (Quintana); and Tafira Wildlife Rehabilitation Center, Cabildo de Gran Canaria, Tafira Baja, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain (Estévez, Calabuig).

Supported by the Loro Parque Foundation, Tenerife, Spain. Address correspondence to Dr. Orós (joros@dmor.ulpgc.es).

## ABBREVIATION

SCL Straight carapace length

Diseases and causes of death among sea turtles stranded in the Canary Islands have been described.<sup>4,5</sup> Variations of the different plasma biochemical and hematologic parameters of loggerhead sea turtles according to the cause of stranding or disease have also been reported.<sup>6</sup> However, reports<sup>7–9</sup> on blood gas and acid-base status of loggerhead turtles, particularly stranded juvenile animals, are limited. The goals of the study reported here were to document venous blood gas, acid-base, and plasma biochemical values for stranded juvenile loggerhead turtles at the time of admission to our rehabilitation facility; compare these values among stranding causes; investigate differences in these values between turtles that survived and those that died; and establish baseline values for rehabilitated juvenile loggerhead turtles.

## Materials and Methods

Sea turtle rehabilitation at the Tafira Wildlife Rehabilitation Center was conducted with authorization of

the Wildlife Department of the Canary Islands Government, in compliance with guidelines of the Tafira Wildlife Rehabilitation Center Animal Care Committee.

**Criteria for selection of cases**—All turtles selected for this study were identified as juvenile specimens on the basis of SCL.<sup>10,11</sup> Medical records for all live, stranded juvenile loggerhead turtles admitted to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center between 2008 and 2009 were reviewed. Data collected included date and cause of stranding; weight; SCL; cloacal temperature at the time of venous blood sample collection; success or failure of rehabilitation; venous pH,  $\text{PO}_2$ , and  $\text{PCO}_2$  values; anion gap; osmolality; and concentrations of lactate, sodium, potassium, chloride, glucose, BUN, and  $\text{HCO}_3^-$  at the time of admission (before administration of any drugs) and, where applicable, immediately before the release of rehabilitated turtles into the wild (without drug administration during the last 7 days of hospitalization).

**Procedures**—A standardized method of blood sample collection and analysis was used for this study.<sup>12</sup> To minimize artifactual changes in hematologic variables due to animal handling, 1 mL of venous blood was anaerobically collected from the cervical sinus of each turtle into a non-heparinized syringe immediately at time of admission. Each sample was immediately analyzed via a portable electronic blood analyzer<sup>d</sup> for pH,  $\text{PO}_2$ ,  $\text{PCO}_2$ , and lactate concentration with cartridges<sup>b</sup> for those analytes and for concentrations of sodium, potassium, chloride, glucose, and BUN with cartridges<sup>c</sup> for those analytes. Because the portable electronic blood analyzer performs analysis of samples at 37°C (98.6°F), the temperature of each turtle was taken to correct the parameters with equations and values considered more appropriate for sea turtles than the portable electronic blood analyzer human-derived algorithms.<sup>13–15</sup> The body temperature of each turtle was recorded with a digital thermometer<sup>d</sup> inserted at least 10 cm into the cloaca and placed against the cloacal wall. The pH,<sup>8,13</sup>  $\text{PCO}_2$ ,<sup>8,14,16,17</sup> and  $\text{PO}_2$ <sup>8,9,14,17</sup> were corrected for the turtle's body temperature via the following equations:

$$\begin{aligned} \text{Temperature-corrected pH} &= \text{pH} + 0.014(\Delta T) \\ \text{Temperature-corrected } \text{PCO}_2 &= \text{PCO}_2(10^{-0.019\Delta T}) \\ \text{Temperature-corrected } \text{PO}_2 &= \text{PO}_2(10^{-0.0058\Delta T}) \end{aligned}$$

where  $\Delta T$  is 37°C – body temperature.

The temperature-corrected  $\text{HCO}_3^-$  concentration was calculated via the Henderson-Hasselbach equation. The solubility coefficient for  $\text{CO}_2$  ( $\alpha\text{CO}_2$ ) and the pKa (logarithmic acid dissociation constant) value were calculated for each patient via species-specific equations for sea turtles.<sup>8,15</sup> The  $\alpha\text{CO}_2$  ranged from 0.039 to 0.049, and the pKa value ranged from 6.15 to 6.20.

Anion gap (mmol/L)<sup>18</sup> and osmolality (mOsm/kg)<sup>19</sup> were calculated via the following equations:

$$\text{Anion gap} = (\text{sodium concentration} + \text{potassium concentration}) - (\text{chloride concentration} + \text{temperature-corrected } \text{HCO}_3^- \text{ concentration})$$

$$\text{Osmolality} = 2 (\text{sodium concentration} + \text{potassium concentration}) + (\text{glucose concentration}/18) + (\text{BUN concentration}/2.8)$$

Rehabilitation sea turtles were placed individually in outdoor pools with a continuous flow of sea water, capacity of 10,000 L, and depth of 1 m, providing plenty of room for swimming. Sea turtles were fed fresh or frozen fish (sardine, Atlantic mackerel, and Atlantic horse mackerel) once a day. Natural light periodicity ranged from 8 hours in the winter to 14 hours in the summer. Clinical evaluation, including physical examination, evaluation of swimming activity, core body temperature (measured from the cloaca), food ingestion, weight, and SCL, was performed daily following a complete clinical assessment protocol.<sup>20–22</sup> Treatments included, when necessary, amputation of the injured flipper, surgical removal of fish hooks, (tube) feeding, cleaning and debridement of the external traumatic injuries, antimicrobial treatment, fluid therapy, correction of floating problems (lung injury or intestinal impaction), and mineral oil gavages. Each turtle was released when it was determined to be convalescent on the basis of clinical parameters and to be in good physical condition. Immediately prior to release, a blood sample from each turtle was analyzed for the same parameters that had been analyzed at the time of admission.

**Statistical analysis**—Statistical analysis was performed with a commercial statistics program.<sup>e</sup> To determine whether the data were normally distributed, the Kolmogorov-Smirnov test was used. Paired data were statistically compared via a paired *t* test for data normally distributed or via a Wilcoxon signed rank test for data that were not normally distributed. Also, initial and convalescent data were statistically compared according to SCL of the turtles via a Mann-Whitney signed rank test for independent data that were not normally distributed. Similarly, initial data from turtles that survived were compared with those from turtles that died. To evaluate the correlation and dependence between 2 random variables, the Pearson correlation coefficient was used. Values of  $P < 0.05$  were considered significant. Because of the small sample size, the initial data set according to the cause of stranding or disease was examined by means of descriptive statistical analysis.

## Results

One hundred two live loggerhead turtles were admitted to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center during the study period. Of these 102 sea turtles, 66 loggerhead turtles were chosen on the basis of our selection criteria (juvenile loggerhead), and initial blood values at admission were compared with those of convalescent values in 60 turtles. Six turtles that had initial data collected did not have convalescent data because during the hospitalization period, they died of sepsis (Table 1) subsequent to severe fracture of carapace ( $n = 1$ ), severe lesions caused by hooks (2), and severe debilitation (3). Median rehabilitation times for different stranding categories were 46 days (range, 14 to 306 days) for fishing net entanglement (48 [72.97%] turtles), 17 days (range, 2 to 38 days) for hook ingestion (6 [9.1%]), 30 days (1 to 127 days) for debilitation (5 [7.6%]), 80.5 days (range, 37 to 124 days) for traumatic injury caused by boat strike (2 [3%]), 31 days for buoyancy

Table 1—Mean (median) ± SD (range) values for physical characteristics, days of hospitalization, and cloacal temperatures for 66 stranded juvenile loggerhead turtles.

Variable	Survived (n = 60)	Died (n = 6)
Body weight (kg)	6.43 (5.12) ± 4.83 (1.03–20.6)	14.11 (8.40) ± 17.01 (0.66–39)
SCL (cm)	32.93 (32.75) ± 8.74 (18–50)	42.10 (39) ± 16.59 (18–61)
Hospitalization time (d)	57.89 (45) ± 45.77 (8–306)	13 (7) ± 16.75 (1–37)
Initial temperature (°C)	22.47 (23.16) ± 1.99 (17.1–24.7)	21.53 (21.35) ± 2.77 (18.2–25.1)
Convalescent temperature (°C)	21.77 (22.40) ± 1.84 (17.3–24.8)	NM

NM = Not measured.

Table 2—Mean (median) ± SD (10th and 90th percentiles) temperature and pH-corrected initial and convalescent blood gas, acid-base, and plasma biochemical values for juvenile loggerhead sea turtles.

Variable	Initial values (n = 60)		Convalescent values (n = 60)		P value
	Mean (median) ± SD	10th percentile–90th percentile	Mean (median) ± SD	10th percentile–90th percentile	
pH*	7.50 (7.50) ± 0.09	7.38–7.59	7.56 (7.56) ± 0.04	7.49–7.63	< 0.001
Pco <sub>2</sub> (Torr)*	31.07 (30.40) ± 5.45	25.67–39.89	33.45 (33.70) ± 4.94	27.36–41	< 0.05
PO <sub>2</sub> (Torr)	70.98 (70.72) ± 14.14	56.56–87.53	61.64 (59.16) ± 17.67	47–71.78	< 0.001
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)*	28.83 (28.69) ± 5.98	21.86–34.78	36.72 (36.54) ± 5.21	29.5–44.16	< 0.001
Lactate (mmol/L)	3.08 (2.02) ± 3.47	0.33–7.20	0.55 (0.30) ± 0.48	0.30–1.01	< 0.001
Sodium (mmol/L)	148.52 (148) ± 4.29	144–153	149.54 (149) ± 3.21	146–153	< 0.01
Potassium (mmol/L)	3.35 (3.40) ± 0.47	2.80–3.90	3.28 (3.20) ± 0.45	2.70–4	0.227
Chloride (mmol/L)*	113.74 (113) ± 5.96	107–120	110.64 (111) ± 4.50	105–118	< 0.001
Anion gap (mmol/L)	9.25 (9.38) ± 4.75	3.66–14.43	5.41 (5.42) ± 4.91	0.60–11.37	< 0.001
Glucose (mg/dL)*	109.89 (112.50) ± 43.43	51.80–152.30	109.31 (110) ± 16.15	85–130	0.599
BUN (mg/dL)†	62.63 (56) ± 25.79	33.60–103.40	131.76 (140) ± 19.36	106–140	< 0.001
Osmolality (mOsm/kg)†	332.08 (330.64) ± 14.58	314.53–349.10	358.85 (360.62) ± 10.61	344.88–369.62	< 0.001

\*Paired data set was normally distributed. †Mean and SD convalescent BUN and osmolality values underestimate the true values because BUN values exceeded the analytic range of the analyzer (140 mg/dL) in 45 sea turtles. Six turtles that had initial data collected did not have convalescent data because they died during the hospitalization period as a result of sepsis subsequent to severe fracture of the carapace (n = 1), severe lesions caused by hooks (2), and severe debilitation (3).

disorder (1 [1.5%]), 14 days for plastic ingestion (1 [1.5%]), and 39 days (range, 37 to 41 days) for unidentified causes (3 [4.5%]).

**Survival**—Initial and convalescent temperature- and pH-corrected blood gas, acid-base, and plasma biochemical values were measured from turtles that were successfully rehabilitated (Table 2). Initial values for the same parameters were measured from turtles that died during the rehabilitation period (Table 3). When comparing initial values at the time of hospital admission of turtles that died with those of turtles that survived, turtles that died during convalescence had significantly ( $P < 0.05$ ) higher initial osmolality and initial temperature-corrected anion gap ( $350.82 \pm 25.15$  mOsm/kg and  $13.74 \pm 6.03$  mmol/L, respectively; Mann-Whitney  $Z$  value,  $-2.584$ ) than did turtles that survived ( $332.08 \pm 14.58$  mOsm/kg and  $9.25 \pm 4.75$  mmol/L, respectively; Mann-Whitney  $Z$  value,  $-2.108$ ). No significant difference was found when comparing the rest of the hematologic variables.

**Acid-base disorders**—To evaluate imbalances in the acid-base status of the turtles, data obtained from 60 turtles were analyzed by comparing initial and convalescent temperature-corrected pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration, and Pco<sub>2</sub>. Regarding the 6 turtles that died during the convalescence period, initial data for these parameters were compared with the initial values of those that survived. In addition, lactate concentration, tem-

Table 3—Mean (median) ± SD (range) temperature and pH-corrected initial blood gas, acid-base, and plasma biochemical values for juvenile loggerhead sea turtles that died during convalescence.

Variable	Initial values (n = 6)	
	Mean (median) ± SD	Range
pH	7.5 (7.56) ± 0.23	7.05–7.68
Pco <sub>2</sub> (Torr)	30.01 (30.36) ± 8.42	16.25–41.08
PO <sub>2</sub> (Torr)	53.28 (54.83) ± 11.73	38.52–68.37
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	29.63 (33.85) ± 10.24	11.05–39.62
Lactate (mmol/L)	5.55 (2.94) ± 6.71	0.30–18.74
Sodium (mmol/L)	155.17 (153) ± 8.70	146–171
Potassium (mmol/L)	3.20 (3.15) ± 0.72	2.40–4.30
Chloride (mmol/L)	115 (112) ± 13.80	102–140
Anion gap (mmol/L)	13.74 (12.34) ± 6.04	7.47–24.25
Glucose (mg/dL)	104.83 (66) ± 103.34	51.80–152.30
BUN (mg/dL)	79.17 (73) ± 24.63	33.60–103.40
Osmolality (mOsm/kg)	350.82 (342.53) ± 25.15	330.64–400.21

perature-corrected anion gap, and electrolyte concentrations were also considered for a complete interpretation of the results.<sup>23</sup> Fifty-seven (86.4%) turtles had some type of acid-base disorder at the time of hospital admission. Of these, 33 (57.9%) had mixed acid-base disorders and 24 (42.1%) had primary acid-base disorders. All acid-base disorders were classified as mild to moderate, except 1 case of severe metabolic and respiratory acidosis (pH, 7.05; temperature-corrected HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration, 11.05 mmol/L; temperature-corrected Pco<sub>2</sub>, 35.3 Torr). Forty-nine (74.2%) turtles had some type of metabolic acidosis, including metabolic and respiratory acidosis (26 [39.4%]), metabolic acidosis

with complete respiratory compensation determined on the basis of detection of low  $P_{CO_2}$  and subsequent normalization of pH (12 [18.2%]), metabolic acidosis with partial respiratory compensation (7 [10.6%]), and mixed metabolic acidosis and respiratory alkalosis (4 [6.06%]). The remaining mixed acid-base disorders were associated with alkaline imbalances ( $n = 3$  [4.5%]) and respiratory acidosis (5 [7.6%]). No biochemical abnormalities related to acid-base disorders were detected in 9 turtles.

**Glucose concentration**—The mean  $\pm$  SD initial glucose concentration for debilitated turtles ( $n = 5$ ) was much lower ( $52.80 \pm 43.01$  mg/dL; median, 31 mg/dL; range, 20 to 123 mg/dL) than the mean initial glucose concentrations of stranded turtles in all other stranding categories ( $114.57 \pm 40.34$  mg/dL; median, 118 mg/dL; range, 20 to 276 mg/dL).

**Influence of size and weight**—When comparing all blood values according to the SCL, we observed a significant difference for the lactate concentration. Turtles with an SCL  $\geq 42$  cm (juvenile turtles<sup>11</sup>) had significantly higher initial lactate concentrations ( $5.11 \pm 3.56$  mmol/L; median, 4.81 mmol/L; range, 1.65 to 18.74 mmol/L) than did turtles with an SCL  $< 42$  cm (juvenile pelagic turtles:  $2.16 \pm 2.12$  mmol/L; median, 1.62 mmol/L; range, 0.30 to 11.92 mmol/L) ( $P < 0.01$ ; Mann-Whitney  $Z$  value, 0.303).

In addition, a positive correlation ( $r = 0.478$ ;  $P < 0.001$ ) was observed between turtle weight and initial lactate concentrations. When studying the association between SCL and other variables, we only observed significant differences for the BUN concentration. We observed a negative association between SCL and BUN concentrations ( $r = -0.376$ ;  $P < 0.01$ ).

**Values generated by the portable electronic blood analyzer at 37°C**—Because results from temperature correction of blood gas and plasma biochemical analysis of ectothermic animals remain problematic when clinical portable analyzers designed for mammals such as the portable electronic blood analyzer are used, the raw data generated by the analyzer at 37°C are provided (Table 4). The pH measured by the portable electronic blood analyzer at 37°C was 2.65% lower than the pH after temperature correction (Wilcoxon  $Z$  value,  $-7.009$ ;  $P < 0.001$ ). The  $P_{CO_2}$  and  $P_{O_2}$  measured by the portable electronic blood analyzer at 37°C were 46.15% ( $-32.84$ ;  $P < 0.001$ ) and 15.78% (Wilcoxon  $Z$  value,  $-7.001$ ;  $P < 0.001$ ) higher than those after temperature correction, respectively. However, the temperature-corrected portable electronic blood analyzer values for pH ( $-1.377$ ;  $P = 0.173$ ) and  $P_{CO_2}$  (0.250;  $P = 0.804$ ) were similar enough to our cal-

culated values to be clinically useful, whereas the portable electronic blood analyzer-corrected values for  $P_{O_2}$  differed by 46.9% from our calculated values (Wilcoxon  $Z$  value,  $-6.791$ ;  $P < 0.001$ ).

## Discussion

In the present study, acid-base disorders were present in most stranded juvenile loggerhead turtles. Turtles that died during rehabilitation had significantly higher initial anion gap and osmolality, compared with turtles that survived. Evaluation of accurately obtained, temperature-corrected venous blood gas, acid-base, and plasma biochemical values can provide important clinical and prognostic information and a valuable basis for the implementation of adequate and rapid treatment for stranded loggerhead turtles admitted to rehabilitation facilities.

Although hematologic and plasma biochemical values from stranded juvenile loggerhead turtles have been described,<sup>6,12</sup> reports<sup>7-9</sup> of blood gas and acid-base status of stranded juvenile loggerhead turtles are limited. Acidosis was detected in most turtles examined in the present study. Mean initial temperature-corrected pH,  $P_{CO_2}$ , and  $HCO_3^-$  concentration values were significantly lower than convalescent values, whereas mean initial lactate concentration and temperature-corrected anion gap were higher than convalescent values. There were no significant differences between initial temperature-corrected pH,  $P_{CO_2}$ , and  $HCO_3^-$  concentration for turtles that died and initial values for those that survived, except for a turtle with severe metabolic and respiratory acidosis that died. In addition, turtles that died had significantly higher initial osmolality and temperature-corrected anion gap than did survivors. Acidosis has also been described in loggerhead turtles experimentally subjected to involuntary submergence<sup>24</sup> and captured by trawl<sup>9</sup> and in cold-stunned Kemp's ridley turtles.<sup>17</sup>

Metabolic acidosis in the turtles of the present study was most likely caused by accumulation of lactic acid, as revealed by the increased anion gap.<sup>25</sup> Potential causes of acid gain include poor tissue perfusion due to shock, extreme exercise trying to get out of fishing nets, involuntary submergence, capture by nets, and decreased acid excretion due to renal dysfunction. In addition, the positive correlation between turtle weight and initial lactate concentration was also observed in loggerhead turtles captured by trawl, suggesting a greater degree of anaerobic metabolism during trawl capture in larger turtles.<sup>9</sup> Mean initial temperature-corrected  $P_{CO_2}$  was significantly lower than mean convalescent temperature-corrected  $P_{CO_2}$  in this study. This could be due to

Table 4—Mean (median)  $\pm$  SD (10th and 90th percentiles) initial and convalescent pH,  $P_{CO_2}$ , and  $P_{O_2}$  for juvenile loggerhead turtles measured with a portable electronic blood analyzer at 37°C (98.6°F).

Variable	Initial values (n = 66)		Convalescent values (n = 60)	
	Mean (median) $\pm$ SD	10th percentile–90th percentile	Mean (median) $\pm$ SD	10th percentile–90th percentile
pH	7.31 (7.32) $\pm$ 0.08	7.22–7.40	7.35 (7.35) $\pm$ 0.04	7.29–7.40
$P_{CO_2}$	55.8 (54.6) $\pm$ 9.63	43.7–70.34	64.99 (63.3) $\pm$ 10.58	53.2–81.2
$P_{O_2}$	84.87 (84) $\pm$ 17.21	66.2–104.8	73.56 (72) $\pm$ 12.2	57.8–89.1

moderate hyperventilation at the time of admission as a compensatory mechanism to counteract the metabolic acidosis. Another study<sup>26</sup> found CO<sub>2</sub> concentrations to be significantly higher in stranded turtles versus foraging and nesting turtles, most likely because of decreased respiratory ventilation in stranded turtles. However, only 5 stranded loggerheads were included in that study.<sup>26</sup>

Although an increase of potassium concentration has been observed in loggerhead turtles with acute metabolic acidosis,<sup>24</sup> we did not observe a significant difference between initial and convalescent potassium concentrations. Different etiologic pathways may explain why 7 of 60 turtles had severe hypoglycemia but 10 of 60 had moderate hyperglycemia. We believe that the high initial glucose concentration may be a result of stress associated with capture and transport before clinical examination. Stress-associated hyperglycemia has been reported in sea turtles.<sup>27,28</sup> Other causes for hyperglycemia include liver disease, pancreatic disease, and overcompensation of gluconeogenic mechanisms.<sup>29</sup> Hypoglycemia in reptiles may be attributed to prolonged anorexia, severe hepatobiliary disease, and septicemia.<sup>30</sup> The mean initial glucose concentration for turtles hospitalized because of debilitation was much lower than that for the rest of turtles. Only 1 turtle hospitalized because of debilitation had normal glucose values. Anemia, hypoproteinemia, and hypoglycemia have been reported in debilitated wild sea turtles.<sup>6</sup>

The convalescent temperature-corrected pH, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration, PCO<sub>2</sub>, and PO<sub>2</sub>; concentrations of blood lactate, electrolytes, glucose, and BUN; and osmolality were similar to those reported for loggerhead turtles.<sup>7-9,12,22,24,26,31-34</sup> The mean convalescent BUN concentration and osmolality reported in our study underestimated the true mean because 45 turtles had convalescent BUN concentrations above the range of the analyzer. Convalescent temperature-corrected anion gap in our study was lower than that reported for healthy loggerhead turtles.<sup>32</sup> Hypoalbuminemia can cause decreased anion gap; however, albumin concentration was not measured in the study reported here. Because studies<sup>17,32</sup> on anion gap in sea turtles are scarce, further investigations on anion gap and clinical diagnosis in sea turtles are needed.

The portable electronic blood analyzer has been used to determine the venous blood gases in marine turtles.<sup>8,9,16,33</sup> However, correction for body temperature of pH, PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration of blood samples of sea turtles with portable analyzers has not always been made.<sup>8,9,16</sup> Our results support studies<sup>17</sup> that found temperature- and pH-corrected acid-base values to be more representative of the true physiologic status of the turtle. Use of noncorrected values undoubtedly leads to erroneous conclusions in the diagnosis of the metabolic and respiratory status of the turtles because the noncorrected pH is lower than after temperature correction, whereas the noncorrected PCO<sub>2</sub> and PO<sub>2</sub> are higher than after temperature correction. In addition, temperature corrections generated by the portable electronic blood analyzer were not valid for PO<sub>2</sub>, differing by 46.9% from our calculated values. Corrections to PO<sub>2</sub> made by the portable electronic blood analyzer were inaccurate because the formulas assumed a much higher

enthalpy of formation required for oxygenation of hemoglobin than has been measured in loggerheads.<sup>8,36</sup> Thus, temperature-based adjustment is essential to obtain accurate values for sea turtles.

Several studies<sup>7,13,17,31,37</sup> have been reported of the effect of temperature on some physiologic functions of sea turtles, such as ventilation and acid-base balance. It has been observed that the blood pH of sea turtles decreases as body temperature increases.<sup>7,13,15,17,37</sup> Several studies found that the venous PCO<sub>2</sub><sup>7,13,17,37</sup> and PO<sub>2</sub><sup>7,13,37</sup> decrease as body temperature decreases. No temperature effect on the interpretation of the results was observed in our study because of the low difference between initial temperature (22.7°C [72.8°F]) and convalescent temperature (21.8°C [71.9°F]). In addition, the range of temperature for the turtles of our study was within that described in another study<sup>13</sup> (15° to 25°C [59° to 77°F]), in which pH, PCO<sub>2</sub>, and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration did not change significantly with the body temperature of the turtles.

This study shows that accurately obtained, temperature-corrected venous blood gas, acid-base, and plasma biochemical values provide essential information for veterinarians in the treatment of stranded loggerhead turtles.

- i-STAT, Heska, Loveland, Colo.
- CG4+ cartridges, Heska, Loveland, Colo.
- EC8+ cartridges, Heska, Loveland, Colo.
- Digi-Sense Thermocouple T, Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, Ill.
- PASW, version 18.0, SPSS Inc, Chicago, Ill.

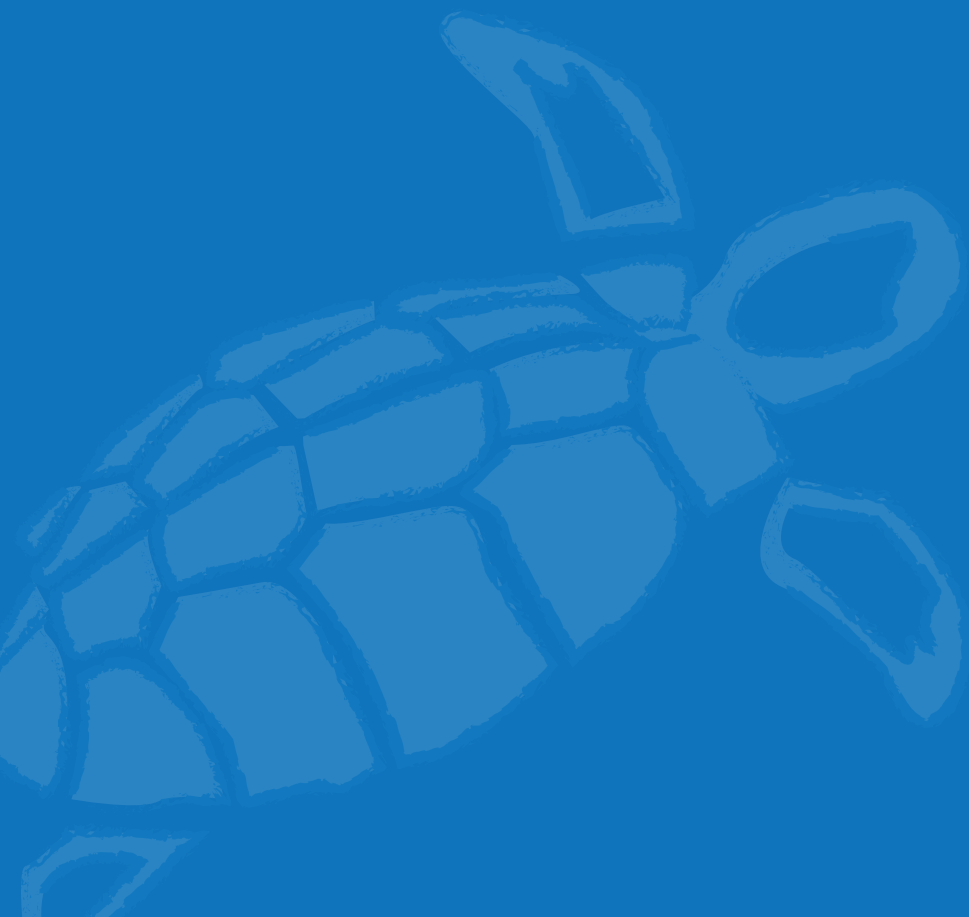
## References

- Mateo JA, Andreu AC, López-Jurado LF: Las tortugas marinas de la Península Ibérica, Baleares, Azores, Madeira y Canarias: Introducción. In: Pleguezuelos JM, ed. *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Granada, Spain: Universidad de Granada Editorial, 1997;433-434.
- Orós J, Calabuig P, Arençibia A, et al. Systemic mycosis caused by *Trichophyton* spp. in an olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*): an immunohistochemical study. *N Z Vet J* 2011;59:92-95.
- Pérez-Jiménez, A. *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). In: Pleguezuelos JM, ed. *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*. Granada, Spain: Universidad de Granada Editorial, 1997;435-437.
- Orós J, Calabuig P, Déniz S. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. *Vet Rec* 2004;155:169-174.
- Orós J, Torrent A, Calabuig P, et al. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Dis Aquat Org* 2005;63:13-24.
- Casal AB, Orós J. Plasma biochemistry and haematology values in juvenile loggerhead sea turtles undergoing rehabilitation. *Vet Rec* 2009;164:663-665.
- Lutz PL, Bergoy A, Bergoy M. Effects of temperature on gas exchange and acid-base balance in the sea turtle *Caretta caretta* at rest and during routine activity. *J Exp Biol* 1989;144:155-169.
- Chittick EJ, Stamper MA, Beasley JF, et al. Medetomidine, ketamine, and sevoflurane for anesthesia of injured loggerhead sea turtles: 13 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2002;221:1019-1025.
- Harms CA, Mallo KM, Ross PM, et al. Venous blood gases and lactates of wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) following two capture techniques. *J Wildl Dis* 2003;39:366-374.
- Bjorndal KA, Bolten AB, Koike B, et al. Somatic growth function for immature loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in southeastern U.S. waters—statistical data included. *Fish Bull* 2001;99:240-246.

11. Seminoff JA, Resendiz A, Resendiz B, et al. Occurrence of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Gulf of California, Mexico: evidence of life-history variation in the Pacific Ocean. *Herpetol Rev* 2004;35:24–27.
12. Casal AB, Camacho M, López-Jurado LF, et al. Comparative study of hematologic and plasma biochemical variables in Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Vet Clin Pathol* 2009;38:213–218.
13. Kraus DR, Jackson DC. Temperature effects on ventilation and acid-base balance of the green turtle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1980;239:R254–R258.
14. Ashwood ER, Kost G, Kenny M. Temperature correction of blood-gas and pH measurements. *Clin Chem* 1983;29:1877–1885.
15. Stabenau EK, Heming TA. Determination of the constants of the Henderson-Hasselbalch equation,  $\alpha\text{CO}_2$  and pKa, in sea turtle plasma. *J Exp Biol* 1993;180:311–314.
16. Harms CA, Eckert SA, Kubis SA, et al. Field anaesthesia of leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*). *Vet Rec* 2007;161:15–21.
17. Innis CJ, Tlusty M, Merigo C, et al. Metabolic and respiratory status of cold-stunned Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*). *J Comp Physiol B* 2007;177:623–630.
18. Wellman ML, DiBartola SP, Kohn CW. Applied physiology of body fluids in dogs and cats. In: DiBartola SP, ed. *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*. 3rd ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006;3–26.
19. Michell AR, Bywater RJ, Clarke KW, et al. Clinical and laboratory assessment of deficits and disturbances. In: Michell AR, Bywater RJ, Clarke KW, et al, eds. *Veterinary fluid therapy*. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, 1989;55–103.
20. Chrisman CL, Walsh M, Meeks JC, et al. Neurological examination of sea turtles. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211:1043–1047.
21. Norton TM. Chelonian emergence and critical care. *Semin Avian Exotic Pet Med* 2005;14:106–130.
22. Flint M, Morton JM, Limpus CJ, et al. Reference intervals for plasma biochemical and hematologic measures in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from Moreton Bay, Australia. *J Wildl Dis* 2010;46:731–741.
23. DiBartola SP. Introduction to acid-base disorders. In: DiBartola SP, ed. *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*. 3rd ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006;229–251.
24. Stabenau EK, Vietti KR. The physiological effects of multiple forced submergences in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Fish Bull* 2003;101:889–899.
25. DeMoraes HAS, Leisewitz AL. Mixed acid-base disorders. In: DiBartola SP, ed. *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*. 3rd ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006;301–314.
26. Deem SL, Norton TM, Mitchell M, et al. Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the Coast of Georgia, USA. *J Wildl Dis* 2009;45:41–56.
27. Aguirre AA, Balazs GH, Spraker TR, et al. Adrenal and haematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiol Zool* 1995;68:831–854.
28. Gregory LF, Schmid JR. Stress responses and sexing of wild Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*) in the Northeastern Gulf of Mexico. *Gen Comp Endocrinol* 2001;124:66–74.
29. Stahl SJ. Hyperglycemia in reptiles. In: Mader DR, ed. *Reptile medicine and surgery*. 2nd ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006; 822–830.
30. Campbell TW. Clinical pathology of reptiles. In: Mader DR, ed. *Reptile medicine and surgery*. 2nd ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006;453–470.
31. Lutz PL, Dunbar-Cooper A. Variations in the blood chemistry of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Fish Bull* 1987;85:37–43.
32. Stamper MA, Harms CA, Epperly SA, et al. Relationship between barnacle epibiotic load and hematologic parameters in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*), a comparison between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. *J Zoo Wildl Med* 2005;36:635–641.
33. Kakizoe Y, Sakaoka K, Kakizoe F, et al. Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *J Zoo Wildl Med* 2007;38:77–84.
34. Whitaker B, Krum H. Medical management of sea turtles in aquaria. In: Fowler MR, Miller RE, eds. *Zoo and wild animal medicine: current therapy*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1999;217–231.
35. MacLean RA, Harms CA, Braun-McNeill J. Propofol anesthesia in loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. *J Wildl Dis* 2008;44:143–150.
36. Giardina B, Galtieri A, Lania A, et al. Reduced sensitivity of O<sub>2</sub> transport to allosteric effectors and temperature in loggerhead sea turtle haemoglobin: functional and spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* 1992;1159:129–133.
37. Moon DY, Mackenzie DS, Owens DW. Simulated hibernation of sea turtles in the laboratory: I. Feeding, breathing frequency, blood pH, and blood gases. *J Exp Zool* 1997;278:372–380.

## CAPÍTULO II

Salt gland adenitis as  
only cause of stranding of  
loggerhead sea turtles *Caretta  
caretta*



**CAPÍTULO II**

**Salt gland adenitis as only cause of stranding of loggerhead sea turtles *Caretta***

***caretta*** .....157

ABSTRACT .....159

INTRODUCTION .....159

MATERIAL AND METHODS .....159

RESULTS .....160

DISCUSSION .....161



# Salt gland adenitis as only cause of stranding of loggerhead sea turtles *Caretta caretta*

J. Orós<sup>1,\*</sup>, M. Camacho<sup>1</sup>, P. Calabuig<sup>2</sup>, A. Arencibia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Morphology, Veterinary Faculty, University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Arucas (Las Palmas) 35416, Spain

<sup>2</sup>Tafira Wildlife Rehabilitation Center, Tafira Baja, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Spain

**ABSTRACT:** The present study describes pathological and microbiological findings in 9 stranded loggerhead sea turtles *Caretta caretta*, whose only observed lesion was bilateral purulent salt gland adenitis. Histological lesions ranged from the presence of abundant eosinophilic material associated with bacterial colonies in the lumen of the central ducts of the glandular lobules to the destruction of the glandular tissue and presence of abundant eosinophilic material composed of heterophils and cell debris, lined by multinucleated giant cells. *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus* sp., and *Vibrio alginolyticus* were the bacteria most frequently isolated. Plasma concentrations of sodium and chloride and plasma osmolality from 2 turtles suffering from salt gland adenitis were, respectively 45.7, 69.2, and 45.7% higher than the mean value for healthy turtles. These cases suggest that failure to maintain homeostasis due to severe lesions in the salt glands can cause stranding and/or death of loggerhead sea turtles.

**KEY WORDS:** Sea turtle · Salt gland · *Caretta caretta* · Loggerhead

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

## INTRODUCTION

All species of sea turtles are included in the IUCN's Red List of Threatened Species ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)). In recent years, increased efforts have been devoted to the conservation of sea turtles, including medical management and pathological studies on stranded animals (Glazebrook & Campbell 1990b, Gordon et al. 1993, Work et al. 2004, Orós et al. 2005).

Sea turtles live in an osmotically challenging environment where the concentration of salt is approximately 3 times greater than that of their internal fluids (Reina et al. 2002). The paired lachrymal salt glands allow sea turtles to maintain ionic homeostasis in a hypersaline environment by secreting a concentrated sodium chloride solution in response to increased plasma sodium (Reina 2000). There are very few descriptions of salt gland diseases in wild sea turtles in the literature (Orós et al. 2005, Flint et al. 2009). No confirmed reports of salt gland adenitis

as the only cause of stranding of sea turtles could be found in the literature.

Since 1994, the Veterinary Faculty at the University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) has been carrying out a survey of lesions and causes of mortality among sea turtles stranded on the coasts of the Canary Islands. This paper describes the morphologic and clinical pathology of salt gland adenitis as a cause of stranding in loggerhead turtles.

## MATERIALS AND METHODS

The 9 loggerhead turtles studied were stranded on the coasts of the Canary Islands between January 2002 and November 2009. Of these, 4 had been previously presented to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center (TWRC) for health evaluation, medical management, and possible rehabilitation. The minimum and maximum times in rehabilitation were, respectively, 2 and

\*Email: [joros@dmor.ulpgc.es](mailto:joros@dmor.ulpgc.es)

12 d, and subsequently all turtles were submitted for necropsy to the Veterinary Faculty at ULPGC.

In addition, 25 loggerhead turtles evaluated as clinically healthy and maintained in outdoor facilities with sea water belonging to the TWRC throughout 2008 and 2009 were used for establishing reference values for plasma concentrations of sodium and chloride and plasma osmolality. Clinical evaluation included physical examination, evaluation of swimming activity, core body temperature (measured from the cloaca), food ingestion, weight to straight carapace length ratio, hydration, and biochemical and hematological pattern.

One ml of blood was collected from the cervical sinus of 25 healthy and 2 diseased turtles (Owens & Ruiz 1980) into 30 IU of lithium heparin (Teramo Europe N. V.) with a 2 ml syringe and a 2.5 × 0.6 mm needle. Blood was placed in plastic tubes (1.5 ml capacity; Eppendorf Ibérica), preserved at 4°C and, about 30 min after blood collection, centrifuged for 15 min at 10 000 × *g* (Mixtasel centrifuge; Selecta); the plasma was then immediately separated using a Pasteur pipette. Plasma was stored for up to 10 d at –20°C while waiting for analysis.

Plasma concentrations of sodium and chloride were measured using an automated chemistry analyzer fitted with an ion selective electrode system (Olympus AU460), and ISE reagents and standards (Olympus) according to the manufacturer's instructions. Plasma osmolality was measured using a vapor pressure osmometer (Wescor Vapro 5520).

Necropsies were carried out using procedures previously described by Wolke & George (1981) and Flint et al. (2009). Macroscopic lesions were recorded and tissue samples from all major organs were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm for light microscopy and stained with hematoxylin and eosin (HE). Special stains performed on all the cases included Ziehl Neelsen (ZN) for acid-fast organisms, and periodic acid-Schiff (PAS) and Grocott's methenamine silver nitrate (GMS) for fungi.

Samples were also taken from gross lesions and cultured on a variety of selective and non-selective media (Oxoid), including blood agar, MacConkey agar, Baird Parker agar for staphylococci, and Sabouraud Dextrose agar for fungi and yeasts. All cultures were incubated aerobically at 25°C. Once a pure growth was obtained, bacteria were identified based on the bio-

chemical profile (API 20 E, API 20 NE, and API 20 Staph, bioMérieux).

## RESULTS

Of the stranded turtles, 7 were female and 2 were male. The means ± SD of the straight carapace length and weight of the turtles were 35.3 ± 4.8 cm (range: 26.8 to 47.2 cm) and 11.1 ± 1.5 kg (range: 3.6 to 24.2 kg), respectively. On the basis of straight carapace length and sexual maturity (estimated from the appearance of their gonads), all turtles were identified as juvenile or subadult specimens.

Sea turtles submitted to the TWRC for health evaluation showed lethargy and anorexia. At necropsy the 9 turtles showed severe bilateral purulent salt gland adenitis. Notable amounts of yellow caseous necrotic debris were detected throughout the parenchyma of the salt glands, occupying areas of up to 2.5 cm in diameter (Fig. 1). No gross lesions were visible in other organs of these turtles.

Histologically, a severe heterophilic salt gland adenitis was diagnosed in the 9 turtles. Lesions ranged from the presence of abundant eosinophilic material associated with bacterial colonies in the lumen of the central ducts of the glandular lobules to the destruction of the glandular tissue and presence of abundant eosinophilic material composed of heterophils and cell debris, lined by multinucleated giant cells. Multinucle-

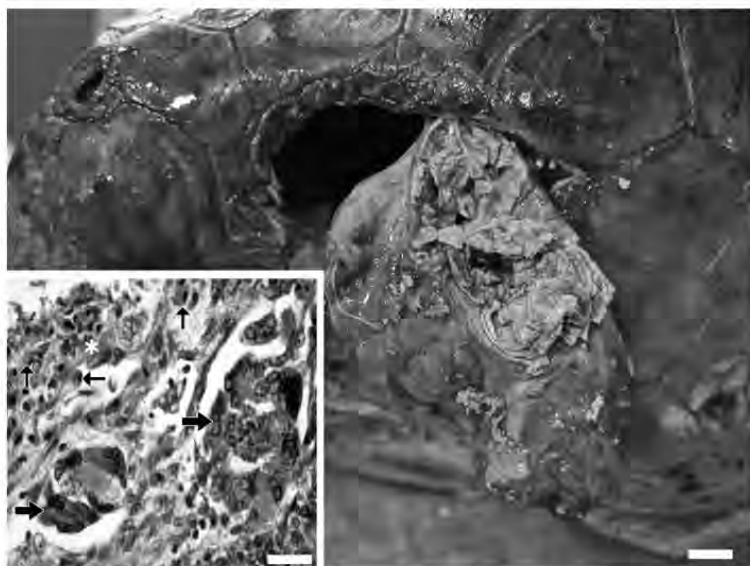


Fig. 1. *Caretta caretta*. Severe purulent salt gland adenitis. Scale bar = 1 cm. Inset: multinucleated giant cells (thick arrows) around an inflammatory focus in a glandular lobule. Note also the heterophils (thin arrows), some of which are degranulated (white star). HE stain. Scale bar = 25 µm

ated giant cells were detected around the inflammatory foci in all cases (Fig. 1, inset). Other lesions included interstitial edema and presence of numerous heterophils in the interstitial tissue. No ZN-, PAS- or GMS-positive microorganisms were detected. No histological lesions were detected in other organs.

The bacteria isolated from the lesions of the salt glands of the stranded turtles were: *Aeromonas hydrophila* (n = 3), *Staphylococcus* sp. (n = 3), *Vibrio alginolyticus* (n = 3), *Aerococcus viridans* (n = 1), and *Citrobacter* sp. (n = 1). A pure culture was obtained from 7 turtles, whereas a mixed culture was obtained from 2 turtles (*A. viridans* with *V. alginolyticus*, and *A. hydrophila* with *Citrobacter* sp.). No fungi or yeasts were isolated from the salt glands.

The means  $\pm$  SD of the straight carapace length and weight of the 25 healthy turtles were  $32.3 \pm 8.9$  cm (range: 18 to 46.5 cm) and  $6.18 \pm 4.1$  kg (range: 1 to 15.3 kg), respectively.

The mean  $\pm$  SD of plasma concentrations of sodium and chloride ( $\text{mmol l}^{-1}$ ), respectively, was  $218.5 \pm 2.5$  and  $187 \pm 5$  for 2 diseased turtles and  $149.9 \pm 2.5$  and  $110.5 \pm 4.2$  for 25 healthy turtles. The mean  $\pm$  SD of plasma osmolality ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) was  $527.5 \pm 21.5$  for 2 diseased and  $361.8 \pm 5.9$  for 25 healthy turtles, respectively.

## DISCUSSION

The severity of the salt gland lesions and the absence of other gross and histological lesions highlight the significance of salt gland adenitis in the differential diagnosis of stranding in marine turtles.

Because the kidney of the sea turtles cannot produce hypertonic urine, excess salt entering the body by ingestion of food or sea water is largely excreted by paired salt glands (Reina et al. 2002). The salt glands are the largest glands in the head of sea turtles and are found dorsal, medial, and posterior to the eye (Wyneken 2001). Salt glands are composed of specialized, secretory cells that concentrate sodium and chloride from the blood to the lumen of secretory tubules through an energy-dependent process (Abel & Ellis 1966). Sea turtle salt glands secrete a solution composed almost entirely of sodium chloride at approximately 1500 to 1800  $\text{mOsm l}^{-1}$  (Marshall & Cooper 1988, Nicolson & Lutz 1989, Reina & Cooper 2000) in response to increasing plasma sodium concentration, and their activity is regulated by microcirculatory changes in or near the glands (Reina 2000).

Very few descriptions of salt gland diseases in wild sea turtles were found in the literature. Calculi have been described in severely dehydrated marine turtles (Flint et al. 2009). Granulomas associated with spiror-

chiid eggs, of variable severity, are also common in stromal tissue that surrounds central canals of lobules and may sometimes extend into and disrupt the glands themselves (Flint et al. 2009).

None of the sea turtles included in our study had intravascular adult flukes or spirorchiid eggs in tissues, including the salt glands. In a previous study on 93 sea turtles stranded on the coasts of the Canary Islands, no adult flukes or trematode eggs in tissues were detected. Authors hypothesized that different alimentary habits of those juvenile and subadult specimens could explain the absence of exposure to cercaria-rich intermediate hosts (Orós et al. 2005).

In a previous survey, heterophilic adenitis was observed in the salt glands of 2 sea turtles (Orós et al. 2005). Because these turtles showed other lesions in other major organs, lesions in the salt glands were not established as the only cause of stranding. No microbiological isolation was attempted.

Bacteria isolated from the salt glands of the stranded loggerhead turtles included microorganisms which can be considered to be potentially pathogenic and/or opportunistic bacteria. *Vibrio alginolyticus* is regarded as a normal inhabitant of seawater (Roberts 1978), but this microorganism was also isolated repeatedly from cases of traumatic ulcerative dermatitis, ulcerative stomatitis, obstructive rhinitis, and bronchopneumonia in green turtles *Chelonia mydas* (Glazebrook & Campbell 1990a, Glazebrook et al. 1993). In addition, green turtles in Hawaii with fibropapillomas were found to be bacteremic, with 4 species of *Vibrio* spp. representing a majority of the bacteria isolated (Work et al. 2003). *Aeromonas hydrophila* has long been recognized as an opportunistic pathogen of reptiles (Reichenbach-Klinke & Elkan 1965, Paré et al. 2006), including loggerhead sea turtles (Orós et al. 2005). In a previous survey on stranded sea turtles from the Canary Islands, *Staphylococcus* was the genus most frequently isolated (22.58%) from lesions in other major organs (Orós et al. 2005). *Aerococcus viridans* caused fibrinonecrotic inflammation in an esophageal diverticulum in a juvenile loggerhead turtle (Torrent et al. 2002). This microorganism is a pathogen of marine lobsters (Marks et al. 1992) and it has also been isolated from fishes in the Atlantic Ocean (Menezes 1992). The majority of reports documenting *Citrobacter* infections in reptiles involve terrestrial chelonians (Jacobson 2007). However, *Citrobacter* sp. was isolated from 4 loggerhead turtles with systemic lesions (Orós et al. 2005).

Glazebrook & Campbell (1990a) reported *Pseudomonas* sp. infections in the salt glands of 2 farmed green sea turtles *Chelonia mydas* due to the removal of foreign material from the main excretory duct leading from the posterior orbit. The procedure involved the

use of forceps which introduced bacteria and led to infection.

The mean values for plasma concentrations of sodium and chloride and plasma osmolality from our 25 healthy loggerhead turtles were similar to those previously reported for this species (Lutz & Dunbar-Cooper 1987, Kakizoe et al. 2007). The very high individual plasma concentrations of sodium and chloride, and plasma osmolality from 2 loggerhead turtles suffering from salt gland adenitis were caused by the misfunction of the salt glands due to the severe lesions observed in these organs. Effects of storage time and temperature after blood sampling from turkeys on plasma concentrations of potassium, sodium, and chloride have been previously reported (Reece et al. 2006). However, there was no variation in storage time between healthy and diseased turtles. Although sea turtles show some plasticity in their internal ionic composition (Lutz & Dunbar-Cooper 1987, Reina & Cooper 2000, Casal & Orós, 2009), they maintain homeostasis in a desiccating environment (Reina et al. 2002). These cases suggest that failure in maintaining homeostasis due to severe lesions in the salt glands can cause stranding and/or death of sea turtles.

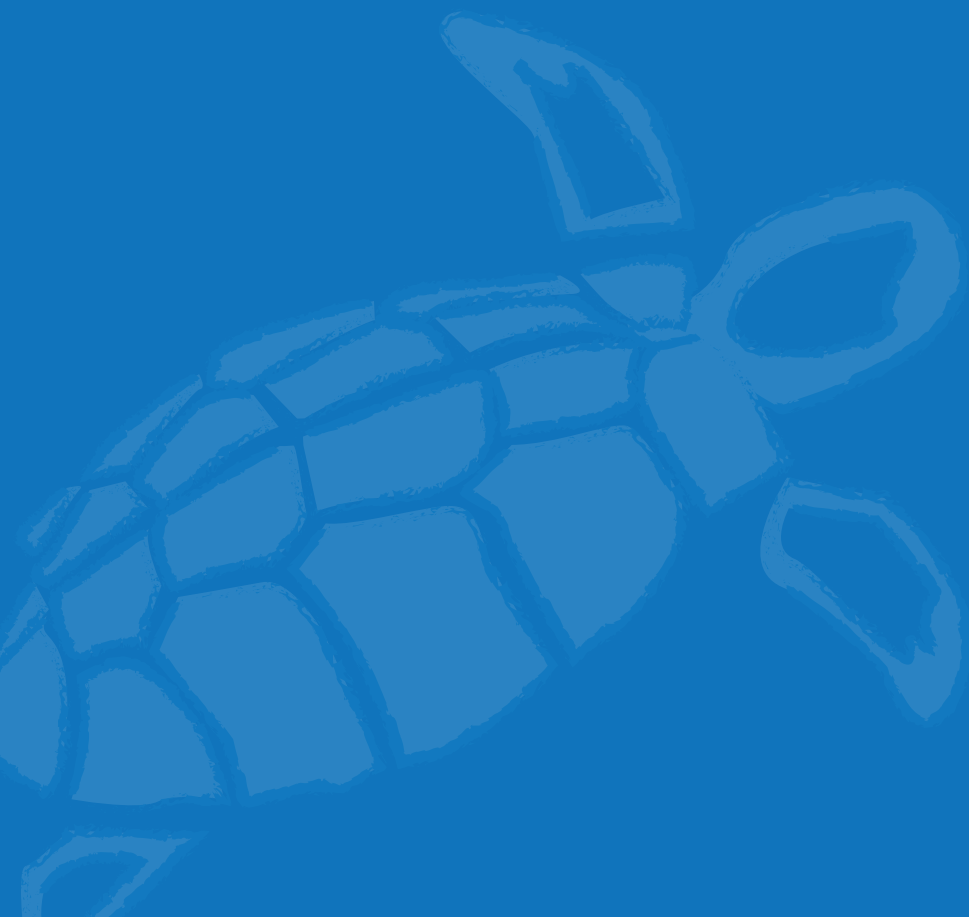
**Acknowledgements.** The authors thank P. Castro and A. Afonso, Department of Morphology, University of Las Palmas de Gran Canaria, for technical assistance. Funding for this paper was partially provided by the autonomic project PI 2007/044, ACIISI, Gobierno de Canarias.

#### LITERATURE CITED

- Abel JH, Ellis RA (1966) Histochemical and electron microscope observations on the salt secreting lachrymal glands of marine turtles. *Am J Anat* 118:337–358
- Casal AB, Orós J (2009) Plasma biochemistry and haematology values in juvenile loggerhead sea turtles undergoing rehabilitation. *Vet Rec* 164:663–665
- Flint M, Patterson-Kane JC, Limpus CJ, Work TM, Blair D, Mills PC (2009) Postmortem diagnostic investigation of disease in free-ranging marine turtle populations: a review of common pathologic findings and protocols. *J Vet Diagn Invest* 21:733–759
- Glazebrook JS, Campbell RSF (1990a) A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia. I. Farmed turtles. *Dis Aquat Org* 9:83–95
- Glazebrook JS, Campbell RSF (1990b) A survey of the diseases of marine turtles in northern Australia II. Oceanarium-reared and wild turtles. *Dis Aquat Org* 9:97–104
- Glazebrook JS, Campbell RSF, Thomas AT (1993) Studies on an ulcerative stomatitis–obstructive rhinitis–pneumonia disease complex in hatchling and juvenile sea turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. *Dis Aquat Org* 16:133–147
- Gordon AN, Kelly WR, Lester JG (1993) Epizootic mortality of free-living green turtles, *Chelonia mydas*, due to coccidiosis. *J Wildl Dis* 29:490–494
- Jacobson ER (2007) Bacterial diseases of reptiles. In: Jacobson ER (ed) *Infectious diseases and pathology of reptiles*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 461–526
- Kakizoe Y, Sakaoka K, Kakizoe F, Yoshii M, Nakamura H, Kanou Y, Uchida I (2007) Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *J Zoo Wildl Med* 38:77–84
- Lutz PL, Dunbar-Cooper A (1987) Variations in the blood chemistry of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Fish Bull* 85:37–43
- Marks LJ, Stewart JE, Hastein T (1992) Evaluation of an indirect fluorescent antibody technique for detection of *Aerococcus viridans* (var.) *homari*, pathogen of homarid lobsters. *Dis Aquat Org* 13:133–138
- Marshall AT, Cooper PD (1988) Secretory capacity of the lachrymal salt gland of hatchling sea turtles, *Chelonia mydas*. *J Comp Physiol B* 157:821–827
- Menezes J (1992) Hazards from pathogens carried by wild fish particularly wrasse used as lice cleaners. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 12:194–195
- Nicolson SW, Lutz PL (1989) Salt gland function in the green sea turtle *Chelonia mydas*. *J Exp Biol* 144:171–184
- Orós J, Torrent A, Calabuig P, Déniz S (2005) Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998–2001). *Dis Aquat Org* 63:13–24
- Owens DW, Ruiz GJ (1980) New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 36:17–20
- Paré JA, Sigler L, Rosenthal KL, Mader DR (2006) Microbiology: fungal and bacterial diseases of reptiles. In: Mader DR (ed) *Reptile medicine and surgery*, 2nd edn. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, p 217–238
- Reece WO, Trampel DW, Koehler KJ (2006) Effects of storage time and temperature after blood sampling from turkeys on plasma concentrations of potassium, sodium, and chloride. *Poult Sci* 85:1095–1097
- Reichenbach-Klinke H, Elkan E (1965) The principal diseases of lower vertebrates. *Diseases of reptiles*. Academic Press, London
- Reina R (2000) Salt gland blood flow in the hatchling green turtle, *Chelonia mydas*. *J Comp Physiol B* 170:573–580
- Reina RD, Cooper PD (2000) Control of salt gland activity in the hatchling green sea turtle, *Chelonia mydas*. *J Comp Physiol B* 170:27–35
- Reina RD, Jones TT, Spotila JR (2002) Salt and water regulation by the leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea*. *J Exp Biol* 205:1853–1860
- Roberts RJ (1978) *Fish pathology*. Bailliere Tiddall, London
- Torrent A, Déniz S, Ruiz A, Calabuig P, Sicilia J, Orós J (2002) Esophageal diverticulum associated with *Aerococcus viridans* in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *J Wildl Dis* 38:221–223
- Wolke RE, George A (1981) *Sea turtle necropsy manual*. NOAA Tech Memo NMFS SEFC-24
- Work TM, Balazs GH, Wolcott M, Morris R (2003) Bacteremia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Dis Aquat Org* 53:41–46
- Work TM, Balazs GH, Rameyer RA, Morris RA (2004) Retrospective pathology survey of green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis in the Hawaiian Islands, 1993–2003. *Dis Aquat Org* 62:163–176
- Wyneken J (2001) *The anatomy of sea turtles*. NOAA Tech Memo NMFS SEFSC-470

## CAPÍTULO III

Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyls in plasma of juvenile and adult nesting *Caretta caretta* from the Eastern Atlantic



### CAPÍTULO III

#### **Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyls in plasma of juvenile and adult nesting *Caretta caretta* from the Eastern Atlantic** .....163

ABSTRACT .....165

INTRODUCTION .....166

MATERIAL AND METHODS (Animal data).....167

RESULTS .....168

DISCUSSION .....173

CONCLUSIONS .....178

# Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyls in plasma of juvenile and adult nesting *Caretta caretta* from the Eastern Atlantic

## Abstract

We evaluated the presence of environmental organohalogenated contaminants in plasma samples from 162 juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Canary Islands and 205 adult, nesting female loggerheads from Cape Verde. Only 5 of the 18 analyzed organochlorine pesticides (OCPs) were detected in both groups of turtles. The average total OCP concentration was higher in turtles from the Canary Islands versus those from Cape Verde (1.98 vs. 0.37 ng/ml). Also, a different polychlorinated biphenyls (PCBs) contamination profiles were observed in juvenile and adult turtles. A negative correlation between size and total PCB concentration was observed in juvenile turtles. Furthermore, correlations with health status were also detected. In addition, all of the organochlorine contaminants (OCs) analyzed showed a clear temporal increase in the concentrations found in turtles from the Canary Islands over the four sampling years (2007 to 2010).

# Introduction

Organochlorine contaminants (OCs), such as organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs), are highly lipophilic chemicals that are resistant to degradation. Their ubiquitous presence in the environment results in biomagnification throughout the food chain. As a consequence, animals at the highest trophic levels also exhibit the highest concentrations of these chemicals. Due to such circumstances, OCs and PCBs are considered persistent organic pollutants, and their use has been banned or reduced in most developed countries worldwide since the late 1970's. However, these pollutants are currently detectable in human, environmental and wildlife samples all over the world (Henríquez-Hernández et al., 2011; Peterle, 1991; Zumbado et al., 2005). Although most environmental and wildlife samples show low concentrations of OC contamination, chronic exposure to these chemicals, even at these low concentrations, may result in a number of deleterious effects in wildlife, such as disruption of immune or reproductive systems, alterations in neurobehavioral development or carcinogenicity (Fox, 2001b).

166

---

Toxic effects can impact wildlife populations and may be especially detrimental to already threatened and/or endangered species. In this context, six of the seven species of sea turtles are included on the World Conservation Union's red list (IUCN 2012). Overexploitation of eggs and meat as a food resource, accidental mortality related to marine fisheries and the degradation of marine and nesting habitats have had a dramatic impact on marine turtle populations in the last decades (Lutcavage et al., 1997a). In addition, the deleterious effects of environmental pollutants is currently listed among top 20 research questions for sea turtle conservation on the global level (Hamann et al., 2010).

The evaluation of OC (OCPs and PCBs) contaminant concentrations in the environment are usually performed by measuring these chemicals in biological samples from species considered as indicators of chemical pollution. Sea turtles possess characteristics that make them useful indicators, such as a long life span, wide geographic range, high trophic position, and site fidelity. Several studies have reported troubling information concerning the presence of environmental pollutant residues in biological samples of sea turtles worldwide (Pugh and Becker, 2001) and specifically in biological samples from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) (D'Illio et al., 2011). The first papers reporting OC concentrations in sea turtle blood were published by Keller et al. (2004a; 2004b). Since then, it has become widely accepted that blood, preferably plasma, can be used to detect and monitor OC contaminants in loggerhead sea turtles (Keller et al., 2004b; Ragland et al., 2011; Swarthout et al., 2010; van de Merwe et al., 2010).

Loggerhead sea turtles are the most common marine turtles along the northwest African coast, specifically in the Macaronesian Archipelagos of the Canary Islands and Cape Verde (Monzón-Argüello et al., 2009). Although Cape Verde is the second



largest loggerhead breeding colony in the North Atlantic and the contains world's third largest loggerhead nesting population (Marco et al., 2011), there are no data on environmental pollutant levels in sea turtles from this archipelago. Conversely, a number of studies have reported background contamination levels in marine turtles of the Canary Islands (Monagas et al., 2008; Orós et al., 2009; Torrent et al., 2004). In addition, diseases and causes of mortality among turtles stranded on the Canary Islands have also been studied (Orós et al., 2004, 2005 and 2012a).

To obtain an overall picture of the chemical contamination levels in sea turtles from the Eastern Atlantic, the present study was designed to compare the levels and profiles of organohalogenated contaminants among two different groups of loggerhead sea turtles from the North African coast: juvenile turtles stranded on the coast of the Canary Islands and adult nesting females from the Cape Verde Archipelago.

## Material and methods

The methodology used in this study (and following chapters) has been extensively developed in the Material and Methods section of this Doctoral Thesis. Therefore, it is unnecessary to repeat all the methods employed in this chapter. Nevertheless, in order to facilitate the reading and focusing on the objectives of each chapter, we have decided to describe now (and in the subsequent chapters) only the data from the sampled animals included in the study of each section.

### Animal data

Blood samples were collected from 162 live, juvenile loggerhead sea turtles stranded on the Canary Islands' coast and submitted to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center (Tafira-WRC) (Gran Canaria Island) between 2007 and 2010 (2007,  $n = 41$ ; 2008,  $n = 45$ ; 2009,  $n = 46$ ; and 2010,  $n = 30$ ). Admitted animals were classified according to the severity of each case as mildly ( $n = 30$ ), moderately ( $n = 118$ ) and severely damaged ( $n = 14$ ). Furthermore, a number of animals ( $n = 11$ ) showed evident signs of emaciation. The most frequent causes of stranding were entanglement in fishing nets ( $n = 101$ ; 62.3%), ingestion of hooks and monofilament lines ( $n = 16$ ; 9.9%), traumatic injuries caused by boat strikes ( $n = 6$ ; 3.7%), crude oil ingestion ( $n = 4$ ; 2.5%), severe malnutrition ( $n = 11$ ; 6.8%), skin diseases ( $n = 6$ ; 3.7%), and other unidentified causes ( $n = 18$ ; 11.1%).

The size of these stranded turtles was evaluated through straight carapace length (SCL) and weight. Stranded turtles from Tafira-WRC ranged in size from 16 to 70 cm and showed a mean SCL value of  $39.30 \pm 11.84$  cm. These turtles also showed a mean weight of close to 9 kg ( $8.73 \pm 7.76$  kg; range: 0.42 - 43.65 kg). On the basis of SCL all the stranded turtles were identified as juvenile (Bjorndal et al., 2001;

Seminoff et al., 2004). Body condition index was calculated using the formula described by Bjorndal et al., (2000a):

$$\text{BCI} = (\text{Body mass (kg)} / \text{SCL}^3) \times 100,000$$

Visualization of the gonads via surgery or endoscopy was not performed; as a consequence the sex of the stranded turtles was unknown.

In addition, 205 female adult loggerhead sea turtles found nesting on the beaches of southeast Boavista Island between 2009 (n = 63) and 2010 (n = 142) were included in this study. A complete visual physical examination was performed and their size was evaluated using the curve carapace length (CCL). Turtles from Cape Verde exhibited CCL mean values higher than 80 cm ( $82.71 \pm 4.08$  cm; range: 66.50 - 104.50 cm).

## Results

168

### OCP Occurrence

Most of the plasma samples from both populations showed detectable levels of some OCPs (95.7% in turtles from the Canary Archipelago and 93.7% in turtles

Variable	Canary Islands (juveniles; n = 162)		
	Mean $\pm$ SD	Median (range)	% Detected
<i>HCB</i>	0.41 $\pm$ 0.47	0.36 (< LOD-3.51)	78.4
<i><math>\alpha</math>-HCH</i>	< LOD	< LOD	-
<i><math>\beta</math>-HCH</i>	0.02 $\pm$ 0.54	0.00 (< LOD-0.32)	22
<i><math>\gamma</math>-HCH</i>	< LOD	< LOD	-
<i><math>\delta</math>-HCH</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Methoxychlor</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Heptachlor epoxide</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Aldrin</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Cis chlordane</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Trans chlordane</i>	< LOD	< LOD	-
<i>p,p'-DDE</i>	0.78 $\pm$ 1.22	0.38 (< LOD-8.94)	89.5
<i>p,p'-DDD</i>	0.003 $\pm$ 0.01	0.00 (< LOD-0.06)	8
<i>p,p'-DDT</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Dieldrin</i>	0.77 $\pm$ 1.72	0.00 (< LOD-8.14)	28.4
<i>Endrin</i>	< LOD	< LOD	-
<i><math>\alpha</math>-Endosulphan</i>	< LOD	< LOD	-
<i><math>\beta</math>-Endosulphan</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Endosulphan-sulphate</i>	< LOD	< LOD	-
<i>Mirex</i>	< LOD	< LOD	-
$\Sigma$ DDTs	0.78 $\pm$ 1.22	0.38 (< LOD-8.94)	89.5
$\Sigma$ Pesticides	1.98 $\pm$ 2.58	1.04 (< LOD-15.10)	95.7

$P^a$  = Mann-Whitney test;  $P^b$  = Chi square test; LOD = Limit of detection; n.s = not significant

from Cape Verde). Nevertheless, only five (HCB,  $\beta$ -HCH,  $p,p'$ -DDD,  $p,p'$ -DDE and dieldrin) out of the 18 OCPs measured were detected in the animals examined in this study, whereas the remaining OCPs evaluated ( $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH, heptachlor epoxide, aldrin, cis-chlordane, trans-chlordane, endrin,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan, sulfate- endosulfan and mirex) were below the LOD (limit of detection) in all of the plasma samples analyzed.

As shown in **Table 7**, among the OCPs quantified,  $p,p'$ -DDE and HCB were the chemicals most frequently detected and at the highest concentrations in both populations. Although the level of OCPs was low, it should be highlighted that the sum of these compounds ( $\Sigma$ OCPs) reached levels as high as 15 ng/ml in a turtle stranded in the Canary Islands.

The level of contamination by OCPs ( $\Sigma$ OCPs) was higher in turtles stranded in the Canary Islands than in nesting turtles from Cape Verde. Thus, animals stranded in the Canarian Archipelago showed higher values of contamination by DDT-derivatives ( $p,p'$ -DDD,  $p,p'$ -DDE, and, consequently,  $\Sigma$ DDTs) than nesting animals from Cape Verde.

**Table 7.** OCPs concentrations (ng/ml) in plasma samples of juvenile and adult loggerhead sea turtles.

Cape Verde (adult female; n = 205)			$P^a/P^b$ -value
Mean $\pm$ SD	Median (range)	% Detected	
0.24 $\pm$ 0.33	0.09 (< LOD-2.18)	80	< 0.001 / < 0.001
< LOD	< LOD	-	-
0.02 $\pm$ 0.046	0.00 (< LOD-0.37)	16	n.s. / n.s.
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
0.20 $\pm$ 0.30	0.11 (< LOD-1.78)	73.7	< 0.001 / < 0.05
0.0009 $\pm$ 0.006	0.00 (< LOD-0.06)	2.4	< 0.05 / n.s
< LOD	< LOD	-	-
0.30 $\pm$ 0.90	0.00 (< LOD-9.50)	25.9	n.s. / n.s.
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
< LOD	< LOD	-	-
0.21 $\pm$ 0.30	0.11 (< LOD-1.78)	73.7	< 0.001 / < 0.001
0.77 $\pm$ 1.21	0.37 (< LOD-12.67)	93.7	< 0.001 / n.s.

**Table 8.** PCBs concentrations (ng/ml) in plasma samples of juvenile and adult loggerhead sea turtles.

Variable	Canary Islands (juveniles; n = 162)		
	Mean ± SD	Median (range)	% Detected
PCB-28	0.34 ± 0.28	0.25 (< LOD-1.24)	96.3
PCB-52	0.04 ± 0.05	0.01 (< LOD-0.27)	52.5
PCB-77	0.001 ± 0.006	0.00 (< LOD-0.05)	8.0
PCB-81	0.004 ± 0.012	0.00 (< LOD-0.08)	13.0
PCB-101	0.04 ± 0.014	0.00 (< LOD- 0.12)	13.0
PCB-105	0.002± 0.01	0.00 (< LOD- 0.09)	4.9
PCB-114	0.0052 ± 0.03	0.00 (< LOD-0.34)	5.6
PCB-118	0.15 ± 0.29	0.07 (< LOD-3.10)	65.4
PCB-123	0.0065 ± 0.02	0.00 (< LOD-0.07)	14.2
PCB-126	0.007 ± 0.02	0.00 (< LOD-0.22)	13.0
PCB-138	1.82 ± 2.39	0.94 (< LOD-14.01)	95.7
PCB-153	1.10 ± 2.19	0.44 (< LOD-22.55)	93.8
PCB-156	0.01 ± 0.04	0.00 (< LOD-0.38)	14.2
PCB-157	0.02 ± 0.04	0.00 (< LOD-0.20)	35.2
PCB-167	0.007 ± 0.02	0.00 (< LOD-0.14)	21.0
PCB-169	0.0013 ± 0.007	0.00 (< LOD-0.06)	4.3
PCB-180	0.58 ± 1.18	0.20 (< LOD-12.01)	88.3
PCB-189	< LOD	< LOD	0.0
ΣM-PCBs	3.46 ± 4.76	1.92 (0.05-40.70)	100.0
ΣDL-PCBs	0.21 ± 0.35	0.13 (0.00-3.61)	84.6
ΣPCBs	4.11 ± 5.90	2.17 (0.05-53.23)	100.0

*P*<sup>a</sup> = Mann-Whitney test; *P*<sup>b</sup> = Chi square test; LOD = Limit of detection; n.s = not significant

In addition, HCB levels were higher in turtles from Canary Islands than those samples from Cape Verde. On the contrary, the levels of contamination by cyclodienes (taking into account that among the cyclodiene pesticides, only dieldrin was detected in the analyzed samples) were similar in both groups of animals.

## PCB Occurrence

As shown in **Table 8**, all of the analyzed samples showed detectable levels of at least one PCB congener. PCB-189 was not detected in any sample from both populations, whereas PCB-28 was the most frequently detected congener (more than 90% of the samples from both populations). In plasma samples from the turtles stranded in the Canary Islands, PCB-138, PCB-153 and PCB-180 were also measured in a high percentage of the samples.

Cape Verde (adult female; n = 205)				<i>P</i> <sup>a</sup> / <i>P</i> <sup>b</sup> -value
Mean (median) ± SD	Median (range)	% Detected		
0.20 ± 1.18	0.16 (< LOD-1.40)	94.1	< 0.001/ n.s.	
0.02 ± 0.05	0.00 (< LOD-0.48)	34.1	< 0.001 / < 0.001	
0.0003 ± 0.002	0.00 (< LOD-0.03)	2	< 0.01 / < 0.05	
0.0009 ± 0.004	0.00 (< LOD-0.04)	3.9	< 0.01 / < 0.01	
0.0012 ± 0.006	0.00 (< LOD-0.06)	5.4	< 0.05 / < 0.01	
0.002 ± 0.01	0.00 (< LOD-0.1)	6.3	n.s. / n.s.	
0.0009 ± 0.007	0.00 (< LOD-0.08)	2.4	n.s. / n.s.	
0.02 ± 0.036	0.00 (< LOD-0.23)	28.8	< 0.001 / < 0.001	
0.0032 ± 0.014	0.00 (< LOD-0.13)	7.8	< 0.05 / < 0.05	
0.0005 ± 0.003	0.00 (< LOD-0.04)	2.4	< 0.001 / < 0.001	
0.05 ± 0.12	0.00 (< LOD-0.88)	33.7	< 0.001 / < 0.001	
0.03 ± 0.09	0.00 (< LOD-0.88)	37.1	< 0.001 / < 0.001	
0.004 ± 0.02	0.00 (< LOD-0.12)	10.7	n.s. / n.s.	
0.003 ± 0.01	0.00 (< LOD-0.06)	9.3	< 0.001 / < 0.001	
0.0008 ± 0.004	0.00 (< LOD-0.03)	4.9	< 0.001/ < 0.001	
0.0003 ± 0.002	0.00 (< LOD-0.03)	1.5	n.s. / n.s.	
0.01 ± 0.03	0.00 (< LOD-0.19)	26.3	< 0.001 / < 0.001	
< LOD	< LOD	0.0	-	
0.33 ± 0.36	0.23 (< LOD-2.45)	97.1	< 0.001 / < 0.05	
0.03 ± 0.053	0.00 (< LOD-0.29)	46.8	< 0.001 / < 0.001	
0.35 ± 0.40	0.24 (< LOD-2.51)	97.1	< 0.001 / < 0.05	

The rank order for the PCB congeners, according to the percentage of samples from the stranded animals of the Canary Islands in which the congener was detected, was the following: PCB-28 > PCB-138 > PCB-153 > PCB-180 > PCB-118 > PCB-52 > PCB-157 > PCB-167. The rest of the congeners were detected in less than 15% of the samples. However, in samples from Cape Verde, the rank order according to the percentage of detection was different: PCB-28 > PCB-153 > PCB-52 > PCB-138 > PCB-118 > PCB-180 > PCB-156 > PCB-157.

As a consequence, the profiles of PCB contamination were different among turtles from both populations. PCB profiles in samples from the Canary Islands were dominated by the hexachlorobiphenyl congeners (PCBs 138 and 153), which accounted for 98.1% of the total PCBs, followed by trichlorobiphenyls (PCB-28: 96.3%), heptachlorobiphenyls (PCB-180), pentachlorobiphenyls (PCB-101 and PCB-118: 68.5%) and tetrachlorobiphenyls (PCB-52: 52.5%). A different profile of PCB contamination was observed in turtles from Cape Verde. These samples were dominated by trichlorobiphenyls (94.1%), followed by hexachlorobiphenyl congeners (43.4%), tetrachlorobiphenyls (34.1%), pentachlorobiphenyls (32.7%) and heptachlorobiphenyls (26.3%).

Furthermore, in turtles from the Canary Islands, the median concentration of PCB-138 (0.94 ng/ml) was the highest among all of the congeners analyzed. However, PCB-28 was the congener measured at the highest concentration (0.2 ng/ml) in turtles from Cape Verde. Nevertheless, the highest concentration of PCB pollution was found in the plasma sample from a turtle stranded in the Canary Islands that showed a PCB-153 value of approximately 23 ng/ml.

As shown in **Table 8**, most of the PCB congeners analyzed individually had higher values in animals from the Canary Islands (IUPAC numbers #28, 52, 77, 81, 101, 118, 123, 126, 138, 153, 157, 180) than in animals from Cape Verde. Consequently, samples from the Canary Islands showed higher median concentrations of PCB contamination ( $\Sigma$ PCBs) than turtles from Cape Verde (2.17 vs. 0.24 ng/ml;  $p < 0.001$ ).

## **Associations between biometric parameters and OCP and PCB contamination concentrations**

172

Although there were no associations between size and OCP concentration in any group of animals, the results were different with regards to PCBs. While turtles from Cape Verde did not present any significant association between OCP or PCB contamination concentrations and size, within the group of stranded turtles from the Canary Islands, multiple negative correlations between size (SCL) and individual PCB congeners were evident (PCB-28,  $r = -0.29$ ,  $p < 0.001$ ; PCB-52,  $r = -0.16$ ,  $p < 0.05$ ; PCB-118,  $r = -0.23$ ,  $p < 0.01$ ; PCB-138,  $r = -0.24$ ,  $p < 0.01$ ; PCB-153,  $r = -0.30$ ,  $p < 0.001$ ; PCB-156,  $r = -0.16$ ,  $p < 0.05$  and PCB-180,  $r = -0.26$ ,  $p < 0.01$ ). As a consequence, in the same group of animals, there were also negative associations between  $\Sigma$ M-PCBs ( $r = -0.28$ ,  $p < 0.001$ ),  $\Sigma$ DL-PCBs ( $r = -0.32$ ,  $p < 0.001$ ) and  $\Sigma$ PCBs ( $r = -0.27$ ,  $p < 0.01$ ). Furthermore, stranded turtles in the Canary Islands with a SCL  $< 42$  cm ( $n = 111$ ) exhibited higher median concentrations of  $\Sigma$ DL-PCBs than those with a SCL  $\geq 42$  cm ( $n = 49$ ) (0.15 vs. 0.08 ng/ml;  $p < 0.05$ ).

## **Health status in relation to OCP and PCB contamination in turtles stranded along the coast of the Canary Islands**

Turtles admitted to TWRC with emaciation ( $n = 11$ ) presented higher median concentrations of PCB-28 than the rest of the stranded turtles (0.63 vs. 0.24 ng/ml;  $p < 0.01$ ). In addition, turtles that were classified as mildly damaged upon admission presented significantly lower median concentrations of PCB-153 (0.23 ng/ml) in comparison to those classified as moderately (0.47 ng/ml;  $p < 0.05$ ) and severely damaged (0.84 ng/ml;  $p < 0.05$ ).

No differences were detected between OCP concentrations and the general status of the turtles. In addition, no correlations were observed between body condition and OCs concentrations.

## Inter-year comparison of OCP and PCB concentrations

As shown in **Fig. 5A**, with respect to turtles stranded in the Canary Islands, the plasma concentrations of OCPs ( $\Sigma$ Pesticides) were higher in turtles stranded in 2009 and 2010 than those in turtles stranded in 2007 and 2008 (3.07 and 1.67 ng/ml vs. 1.32 and 1.68 ng/ml). This result was also evident with respect to the plasma concentrations of  $\Sigma$ M-PCBs,  $\Sigma$ DL-PCBs and  $\Sigma$ PCBs (**Fig. 5B**).

On the contrary, during the two years of sampling in Cape Verde (2009 and 2010), a significant decrease in contamination concentrations by  $\Sigma$ MPCBs,  $\Sigma$ DL-PCBs and  $\Sigma$ PCBs among turtles evaluated in 2010 was evident compared to samples from turtles studied in 2009 (**Fig. 5B**). We also found a similar result regarding the OCP contamination concentrations in female turtles from Cape Verde; there were higher OCP contaminant concentrations in plasma from animals sampled in 2009 than in samples from animals studied in 2010 (**Fig. 5A**).

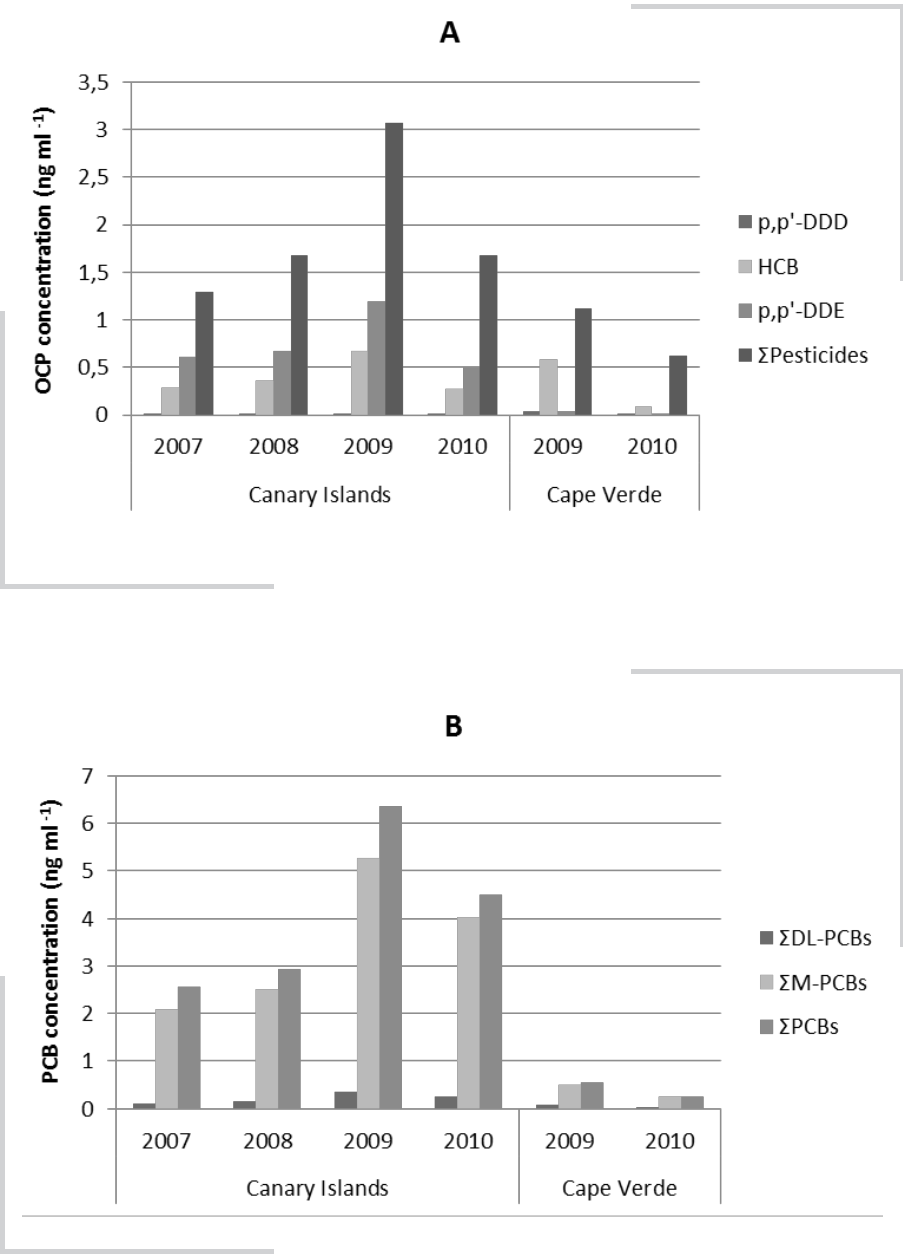
## Discussion

### Geographical patterns

The present study evaluated the overall OC contamination levels in sea turtles from the West African coast comparing contaminant levels and profiles among animals from two different zones of this part of the Atlantic Ocean and of two different size classes. Additionally, it represents the first study showing the OC contamination levels for any turtle species from Cape Verde.

As expected, and in accordance with the literature (D'Illio et al., 2011), most of the 367 samples from juvenile and adult specimens of loggerhead sea turtles included in this study showed detectable levels of a number of OCs. Loggerhead sea turtles from the Canary Islands showed higher OC (OCP and PCB) levels than turtles from Cape Verde. Other authors have also reported differences in OC contamination levels in sea turtle tissues from different locations around the world (Alava et al., 2011; Corsolini et al., 2000; Gardner et al., 2003; Labrada-Martagón et al., 2011; Lake et al., 1994; Mckenzie et al., 1999; McKim and Johnson, 1983; Ragland et al., 2011; Swarthout et al., 2010). Similarly, the overall PCB contamination level was higher in turtles from the Canary Islands ( $\Sigma$ PCBs,  $\Sigma$ M-PCBs, and  $\Sigma$ DL-PCBs) than in female turtles from Cape Verde. One possible explanation for this could be that the Canary Islands are a highly developed archipelago with a number of polluting industries, while Cape Verde is an underdeveloped country with virtually no traditional polluting industries. As a consequence, it is expected that the pollution level in Cape Verde would be lower than in the Canary Islands. However, the differences found in our study between turtles from these two areas may not only be due to different degrees of contamination but could also be due to age, reproductive status or corporal condition. The fact that juvenile turtles from the

Canary Islands were not at breeding age could also exaggerate the significant difference observed between the two groups of turtles. It is also important to bear in mind that lower levels of contaminants in adult females could indicate OC depuration through the excretion of these contaminants via maternal transfer to eggs (Mckenzie et al., 1999). Previous studies have reported strong evidence that OCs are maternally transferred to eggs in marine turtles (Stewart et al., 2011; van de Merwe et al., 2010).



**Figure 5.** Temporal trend in the contamination levels of OCPs (A) and ΣDL-PCBs, ΣM-PCBs and ΣPCBs (B) in turtles from the Canary Islands and Cape Verde during the years studied.



## Organochlorine pesticides

Regarding the OCPs measured in this study, *p,p'*-DDE was the predominant compound detected in both groups of animals in this study followed by HCB,  $\beta$ -HCH, dieldrin, and *p,p'*-DDD. This supports previous studies in which *p,p'*-DDE has generally been the pesticide present in greatest concentrations in sea turtles, independently of the species selected and their geographical origin (Alava et al., 2011; Guirlet et al., 2010; Keller et al., 2004a; Lake et al., 1994; Lazar et al., 2011; Mckenzie et al., 1999; Perugini et al., 2006; Ragland et al., 2011; Rybitski et al., 1995; Storelli et al., 2007; Storelli and Marcotrigiano, 2000).

As previously mentioned, technical DDT (*p,p'*-DDT) was banned in the late 1970s in North America and Europe. However, currently it is well known that this pesticide is still being used in underdeveloped African countries (for malaria control, for example). In fact, DDT has recently been detected in pine needles (Villa et al., 2003) and serum samples from people living in the Canary Islands (Zumbado et al., 2005). In an attempt to evaluate the possibility that a source of DDT could still be active in the marine environment of both archipelagos, we employed the *p,p'*-DDE/ $\Sigma$ DDT ratio. The ratio of the concentrations of *p,p'*-DDE to  $\Sigma$ DDT has been used to evaluate the chronology of DDT input in the environment (Aguilar, 1984). Values above 0.6, which is regarded as a critical threshold, indicate a lack of new sources of DDT entering the ecosystem. Despite the fact that this pesticide is still being used in Sub-Saharan Africa, and the Canary Islands and the Cape Verde Archipelago are located close to the West African coast, the ratio found in our study (0.99 for both groups of turtles) seems to indicate that there is not an active source of technical DDT in the marine environment surrounding these archipelagos.

## PCB congeners

With respect to PCBs, our results showed a pattern of PCB congeners in juvenile turtles from the Canary Islands that was clearly dominated by the more highly chlorinated ones (hexachlorobiphenyls; PCB-138 > PCB-153 > PCB-180). These results agree with those previously reported for tissues from loggerhead sea turtles (Corsolini et al., 2000; Keller et al., 2004a; Lazar et al., 2011; Orós et al., 2009; Perugini et al., 2006; Storelli et al., 2007) and from other marine turtle species (Miao et al., 2001; Orós et al., 2009; Richardson et al., 2010). Conversely, in turtles from Cape Verde, PCB-28 was the most frequently detected congener, and it was detected at the highest concentration. Therefore, the Cape Verde PCB profile was dominated by the lower-chlorinated congeners (trichlorobiphenyls). A similar finding was reported previously by Gartner et al. (2003) in green sea turtles from the Eastern Pacific. Differences in PCB patterns in turtles may be attributed to differences in the composition of congeners released into the marine environment by different pollution sources and/or to dietary differences or to differences in the abilities of various species and populations to metabolize PCBs. Although reptilian PCB

biotransformation has been demonstrated (Schlezingner et al., 2000), insufficient data are available regarding the metabolic capacity of sea turtles for PCBs.

## OC accumulation with size and nutritional status

As previously stated, OCPs and PCBs accumulate in the fatty tissues of exposed animals throughout their lifespan, and increasing concentrations of these chemicals are evident with age (and therefore, with growth). A recent study in adult male loggerhead sea turtles observed positive correlations between OC concentrations and turtle size, which suggests that the somatic growth rate plays a role in persistent organic pollutant concentrations in a turtle throughout its life (Ragland et al., 2011). However, unexpectedly, our results showed that larger juvenile turtles in the Canary Islands had lower concentrations of PCB than smaller ones. Few studies have investigated the phenomena of OC bioaccumulation in relation to sea turtle growth period (Keller et al., 2004a; Lazar et al., 2011; Mckenzie et al., 1999; Ragland et al., 2011), and results are contradictory. Thus, while some studies have reported increased PCB-52 and PCB-114 contamination levels in relation to size (CCL) (Lazar et al., 2011), other studies have found negative correlations with size for the pesticides mirex and chlordane (Keller et al., 2004a) and for  $\Sigma$ PCBs and DDE (Mckenzie et al., 1999). A possible explanation for the higher levels in smaller turtles could be the effect of growth dilution, where environmental pollutants accumulate at a higher rate during the earlier life stages, while lower exposure in the neritic stage, coupled with somatic growth, dilutes the concentrations in the tissues of larger animals (Keller et al., 2004a; Mckenzie et al., 1999). On the contrary, turtles stranded on the coast of the Canary Islands may have visited different areas with different degrees of contamination during migration, resulting in differences in exposure levels for each animal (Ziswiler, 1986). Without knowing the migratory route and previous contaminant exposure of these animals, it is difficult to provide an accurate explanation. In addition, turtles with a SLC < 42 cm showed higher concentrations of non-ortho and mono-ortho PCBs ( $\Sigma$ DL-PCBs) than those with SLC  $\geq$  42 cm. Dioxin-like compounds have the potential to cause deleterious effects on animals, such as endocrine disruption or immunological impairment, at any concentration (Van den Berg et al., 1998). However, exposure to di-ortho congeners (non-dioxin-like) must also be taken into consideration because there is a higher prevalence of these congeners in the environment.

The effects of OC contaminants on clinical health parameters or immune system in sea turtles have been described in very few studies (Keller et al., 2004c; Swarthout et al., 2010). Correlations between clinical health parameters and OCs in juvenile loggerhead sea turtles have suggested that sea turtles may be relatively sensitive to sub lethal effects of OCs. Clearly, more data are needed on the possible effects of contaminants in sea turtles in all life stages (egg, hatchling, juvenile adults).

## Lipid mobilization in debilitated turtles

In addition to size, sex and feeding areas, nutritional status may also influence the OC contamination concentration in sea turtles, especially the concentrations observed in plasma. Previous studies have shown a strong correlation between lipids in fat stores and blood OC levels in sea turtles (Keller et al., 2004a), which indicates that when lipids are mobilized (to meet energy demands, egg production and tissue maintenance), OCs are released into the bloodstream (Hamann et al., 2002; Kwan, 1994). Lipids are also mobilized in debilitated turtles to meet energy demands during fasting. Most turtles that were admitted to the Tafira-WRC of the Canary Islands showed poor body conditions and weakness because of their inability to eat properly. Debilitated animals generally become aphagic and mobilize lipids stored in their body for energy (Keller et al., 2004a; Orós et al., 2009; van de Merwe et al., 2010). Therefore, it is most likely that the mobilization of fat stores into the bloodstream could also mobilize OCs and elevate their concentration in blood. In addition, turtles that showed severe cachexia (n = 11) presented higher concentrations of PCB-28 in comparison to the other turtles analyzed. Similar results were found for PCB-153 with higher levels in turtles classified as severely damaged upon admission. However, due to the small sample size of these groups, conclusions from these results must be interpreted with caution.

Nevertheless, the fact that juvenile turtles from Canary Islands were stranded and a certain percentage of them were emaciated is a potential explanation for this group exhibiting high plasma OC concentrations compared to healthy nesting female adults.

## Inter-year comparison of OC concentrations

The inter-year differences observed in OC contamination among sea turtles stranded along the coast of the Canary Islands suggests an increasing level of contamination in sea water in this archipelago. Although our results were based on samples from different individuals, during the years studied we noted a trend towards an increase in the contamination level. Curiously, 2009 showed a higher OC load in all of the analyzed samples. Because OC levels in blood can experience fluctuations during lipid mobilization (long migrations, breeding, or disease) (Keller et al., 2004a), the correct interpretation of this increase requires further evaluation of temporal trends.

## Conclusions

1. This study provides the first data on OC concentrations in loggerhead sea turtles from Cape Verde and is the first study in which sea turtles from different areas of the eastern Atlantic were compared.

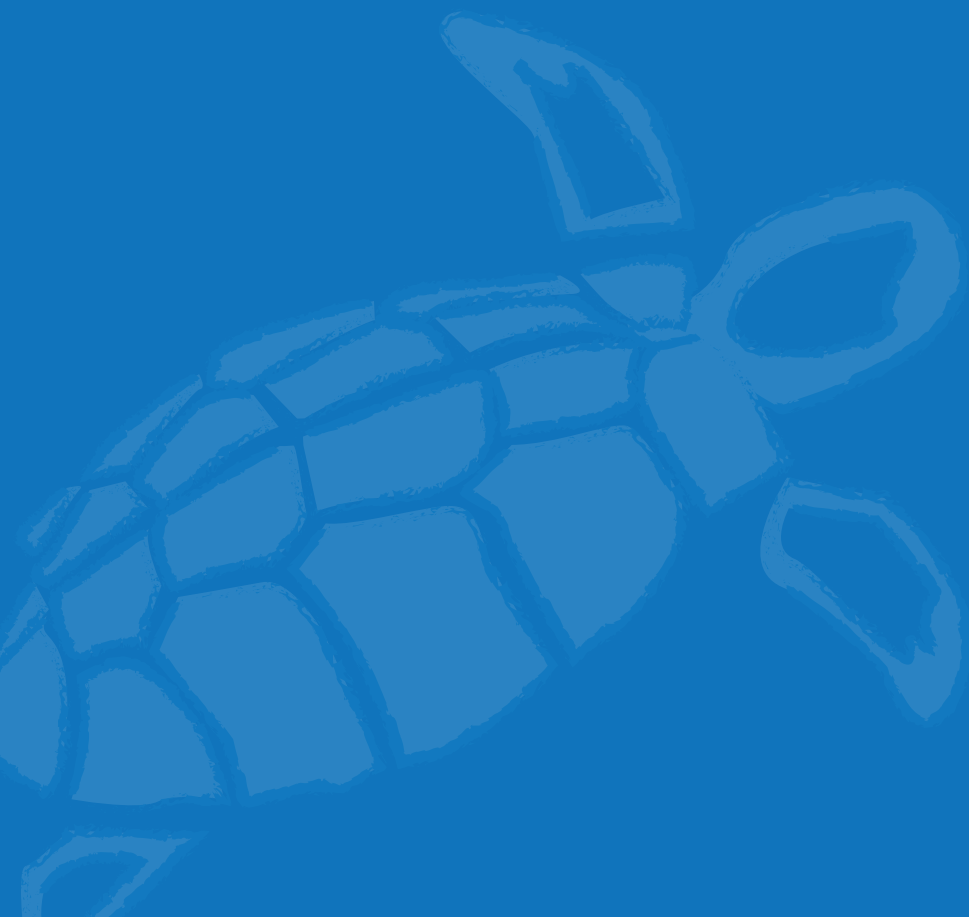
2. In general, juvenile turtles stranded in the Canary Islands showed higher OC concentrations than adult, nesting loggerhead turtles from Cape Verde. We have to take into account that juvenile turtles from the Canary Islands were not at breeding age and were younger and more emaciated than turtles from Cape Verde, but also that the higher contaminants levels observed in the former could be due to a higher degree of environmental contamination in this area.

3. In addition, whereas the OCP profile was similar between the juvenile and adult turtles, different PCB patterns were observed in the two groups of turtles. Plasma samples from juvenile turtles were dominated by more highly chlorinated homologues, while samples from adult female loggerheads were dominated by lower-chlorinated congeners. Dietary differences between juvenile and adult loggerhead sea turtles and differences in the congener contamination in both areas could explain this difference. In addition, the smaller turtles showed higher PCB congener levels than larger turtles from the Canary Islands. This finding is contrary to the expected result (bioaccumulation along the lifespan). As other authors have suggested, we support the growth dilution effect as a possible explanation.

4. The significant temporal differences in OC concentrations among turtles from the Canary Islands suggest increasing environmental contamination in recent years.

# CAPÍTULO IV

Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)



## CAPÍTULO IV

### Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles

<b>(<i>Caretta caretta</i>)</b> .....	179
ABSTRACT .....	181
INTRODUCTION .....	182
MATERIAL AND METHODS (Animal data).....	183
RESULTS .....	185
DISCUSSION .....	187
CONCLUSIONS .....	189

## **Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)**

### **Abstract**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were measured in plasma samples of 162 juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from Canary Islands, and 205 adult nesting loggerheads from Cape Verde. All the 367 samples showed detectable values of some type of PAH. Phenanthrene was the PAH most frequently detected and at the highest concentration in both populations. Median concentrations of  $\Sigma$ PAHs in the plasma of loggerheads from the Canary Islands and Cape Verde were similar (5.5 and 4.6 ng/ml, respectively). Di- and tri-cyclic PAHs were predominant in both populations suggesting petrogenic origin rather than urban sources of PAHs. In the group of turtles from Canary Islands, there was evident an increasing level of contamination over the last few years. The present study represents the first data of contamination by PAHs in sea turtles from the studied areas.

# Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous organic contaminants found in air, water, sediment, and soil. The United States Environmental Protection Agency (USEPA) identified 16 PAHs as priority environmental pollutants. PAHs are important due to their capability of bioaccumulation in invertebrate species (Meador et al., 1995), and their known toxic effects (Moore et al., 1989). Studies investigating PAHs have primarily focused on aquatic ecosystems (Kannan and Perrotta, 2008; Marsili et al., 2001). The major inputs of PAHs into the marine environment occur via industrial discharge and urban runoff, vessel operation, tanker accidents, atmospheric deposition, and exploration production (Van Metre et al., 2000). Oil spills are rare events, but they have the potential to be spectacularly devastating to vulnerable resources (Pérez et al., 2008).

The marine environments of the Canary Islands (Spain) and Cape Verde (Republic of Cape Verde) are characterized by a great variety of endemic species. Their geographical situation, with very high tanker traffic around the islands, makes these areas especially sensitive to contamination by PAHs. This traffic is higher in the Canary Islands than in Cape Verde, suggesting the hypothesis that greater levels of PAHs could be expected in the Canarian turtles. In fact, international recognition of the waters of the Canary Islands as a Particularly Sensitive Sea Area (PSSA) was adopted recently by the International Maritime Organization (IMO 2007). Although strategies for monitoring pollution are mandatory in these archipelagos, studies monitoring PAHs are very scarce (Peña-Méndez et al., 1999, 2001).

The most common sea turtle species in the Canary Islands and Cape Verde is the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) (Marco et al., 2011; Monzón-Argüello et al., 2009). Monzón-Argüello et al. (2009) demonstrated that juvenile loggerhead turtles found in the Canary Islands come mainly from the South Florida, Northeast Florida, North Carolina, and Mexico. They found a genetic stability in temporal and size analysis of the Canary Islands loggerhead population, showing a long period of residency. Moreover, this population shares developmental habitats in the North East Atlantic with other Atlantic and Mediterranean loggerhead populations (Margaritoulis et al., 2003). The loggerhead turtle population from Cape Verde has been internationally recognized as the second largest population of this species in the North Atlantic, and the third largest worldwide (López Jurado et al., 2007).

Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands have been previously reported (Orós et al., 2005). However, data available for baseline levels of contaminants and effects on the turtle populations of the



Canary Islands are scarce (Monagas et al., 2008; Orós et al., 2009; Torrent et al., 2004). Analysis of blood samples from sea turtles is a reliable non-lethal method to estimate environmental exposure to contaminants, especially persistent organic pollutants and metals (van de Merwe et al., 2010). However the utility of this biological sample to evaluate environmental exposure to PAHs has not been explored in depth.

To fill this gap, in this study, concentrations of 16 USEPA priority PAHs were measured in the plasma of 162 juvenile loggerhead turtles stranded on the coasts of the Canary Islands, and 205 adult nesting loggerheads from the Cape Verde archipelago.

## Material and methods

### Animal data

Between 2007 and 2010, the 162 juvenile loggerhead sea turtles stranded in the Canary Islands and submitted to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center (Tafira-WRC, Gran Canaria Island) were included in this study. Once rescued, clinical evaluations, including a physical examination, evaluation of swimming activity, food ingestion, weight, straight carapace length (SCL), and hydration, were performed daily following a complete clinical protocol. Blood samples were obtained before turtles were fed. The causes of stranding included: entanglement in fishing nets ( $n = 101$ , 62.3%), ingestion of hooks and monofilament lines ( $n = 16$ , 9.9%), traumatic injuries caused by boat strikes ( $n = 6$ , 3.7%), crude oil ingestion ( $n = 4$ , 2.5%), malnutrition ( $n = 11$ , 6.8%), skin diseases ( $n = 6$ , 3.7%), and other unidentified causes ( $n = 18$ , 11.1%). On the basis of SCL, all turtles were identified as juveniles (Bjorndal et al., 2001). Visualization of the gonads via surgery or endoscopy was not performed.

In addition, 205 female adult loggerhead sea turtles nesting on the beaches of southeast Boavista Island (Cape Verde) between 2009 and 2010 were included in this study. A complete visual physical examination was performed and curved carapace length (CCL) was measured. All blood samples were collected from turtles in their way back to the sea (after egg laying).

Values of SCL, CCL, and weight of the studied turtles are presented in **Table 9**. Although the age of the turtles it is difficult to determine, size can provide information about the relationship between age and PAH levels. In this sense, we found that most female nesting turtles were small-sized females ( $82.2 \pm 3.17$  cm,  $n = 197$ ), and only 8 were large turtles ( $94.87 \pm 4.77$ ).

**Table 9.** Mean and standard deviation and maximum and minimum (range) values for physical characteristics of stranded juvenile loggerhead turtles from the Canary Islands and adult nesting loggerheads from Cape Verde.

	Canary Islands (n = 162)	Cape Verde (n = 205)
<b>CCL (cm)</b>	39.30 ± 11.84 (16.00-70.00)	82.71 ± 4.09 (66.50-104.50)
<b>SCL (cm)</b>	35.38 ± 10.66 (14.27-64.10)	n.m.
<b>Weight (kg)</b>	8.74 ± 7.77 (0.42-43.65)	n.m.

CCL = Curved carapace length; SCL = Straight carapace length; n.m. = not measured.

**Table 10.** Concentrations of PAHs, ΣPAH, and PAH profiles (ng/ml) in plasma of stranded juvenile loggerhead turtles from the Canary Islands and adult nesting loggerheads from Cape Verde.

	Canary Islands (n = 162)		
	Mean ± SD	Median (range)	% Detected
<i>Naphtalene</i>	1.94 ± 2.02	1.68 (0.00-10.29)	63.9
<i>Acenaphtylene</i>	BDL	BDL	BDL
<i>Acenaphtene</i>	0.03 ± 0.27	0.00 (0.00-0.92)	8.2
<i>Fluorene</i>	0.13 ± 0.35	0.00 (0.00-1.73)	15.2
<i>Anthracene</i>	0.01 ± 0.17	0.00 (0.00- 2.10)	0.6
<i>Phenanthrene</i>	4.19 ± 3.48	3.53 (0.00-23.45)	93.7
<i>Fluoranthrene</i>	0.03 ± 0.17	0.00 (0.00-1.61)	5.7
<i>Pyrene</i>	0.04 ± 0.21	0.00 (0.00-1.52)	4.4
<i>Benzo [a] anthracene</i>	0.005 ± 0.01	0.00 (0.00-0.07)	22.2
<i>Chrysene</i>	0.003 ± 0.009	0.00 (0.00-0.05)	13.3
<i>Benzo [b] fluoranthene</i>	BDL	BDL	BDL
<i>Benzo [k] fluoranthene</i>	BDL	BDL	BDL
<i>Benzo [a] pyrene</i>	BDL	BDL	BDL
<i>Indeno [1,2,3-c,d] pyrene</i>	0.0001 ± 0.0008	0.00 (0.00-0.01)	0.6
<i>Dibenza [a,h] anthracene</i>	0.0007 ± 0.004	0.00 (0.00-0.04)	3.2
<i>Benzo [g,h,i] perylene</i>	BDL	BDL	BDL
<i>Tri-cyclic</i>	4.36 ± 3.70	3.60 (0.00-25.07)	94.3
<i>Tetra-cyclic</i>	0.08 ± 0.32	0.00 (0.00-3.13)	31.6
<i>Penta-cyclic</i>	BDL	BDL	BDL
<i>Hexa-cyclic</i>	0.0008 ± 0.004	0.00 (0.00-0.04)	3.2
<b>ΣPAHs</b>	<b>6.38 ± 4.95</b>	<b>5.50 (0.01-29.46)</b>	<b>100</b>

<sup>a</sup> = Mann-Whitney test;

<sup>b</sup> = Chi-square test; BDL = Below detection limit; n.s. = not significant.

<sup>c</sup> We have excluded from the comparison stranded turtles due to crude oil to avoid jeopardizing the contaminants levels measure.

# Results

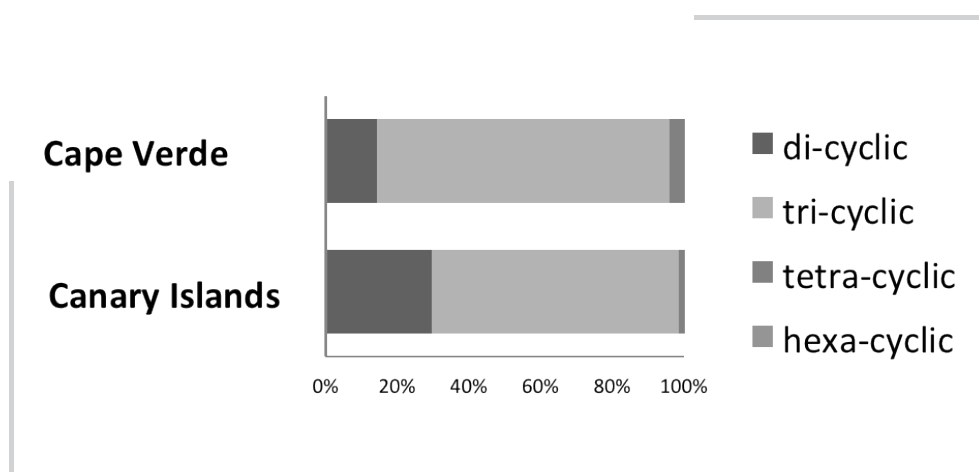
## PAHs occurrence

All of the 367 plasma samples, from both populations of loggerhead turtles, showed detectable values of some type of PAH. PAH concentrations measured in the plasma of the loggerheads from both populations are shown in **Table 10**. Phenanthrene was the most frequently detected chemical (more than 90% of the samples), and at the highest concentration. However, acenaphtylene, benzo [b] fluoranthene, benzo [k] fluoranthene, benzo [a] pyrene, and benzo [g, h, i] perylene were not detected in any sample. The existence of relevant differences in PAH concentrations between the two populations involved in this study is remarkable. Turtles from the Canary Islands showed higher levels of naphthalene than turtles from Cape Verde. In addition, this compound was more frequently detected in samples from the Canary Islands than in samples from Cape Verde (64% vs.

Cape Verde (n = 205)			
Mean ± SD	Median (range)	% Detected	P <sup>a</sup> /P <sup>b</sup> -value
0.86 ± 1.29	0.00 (0.00-5.93)	39.5	< 0.001/ <0.001
BDL	BDL	BDL	-
0.601 ± 0.64	0.46 (0.00-4.77)	84.4	< 0.001/ < 0.001
0.27 ± 0.45	0.18 (0.00-4.76)	65.4	< 0.001/ < 0.001
0.04 ± 0.46	0.00 (0.00-6.48)	1.0	n.s. / n.s.
3.94 ± 3.7	2.69 (0.00-32.87)	99.0	n.s. / < 0.01
0.09 ± 0.19	0.00 (0.00-1.24)	31.2	< 0.001/ < 0.001
0.13 ± 0.39	0.00 (0.00-3.60)	18.5	< 0.001/ < 0.001
0.006 ± 0.01	0.00 (0.00-0.08)	43.9	< 0.01/ < 0.001
0.002 ± 0.007	0.00 (0.00-0.06)	16.6	n.s. / n.s.
BDL	BDL	BDL	-
BDL	BDL	BDL	-
BDL	BDL	BDL	-
0.0001 ± 0.0009	0.00 (0.00-0.01)	0.5	n.s. / n.s.
0.0005 ± 0.004	0.00 (0.00-0.04)	3.9	n.s. / n.s.
BDL	BDL	BDL	-
4.85 ± 4.38	3.36 (0.00-40.16)	99.5	n.s. / < 0.01
0.23 ± 0.53	0.02 (0.00-4.15)	68.5	< 0.001/ < 0.001
BDL	BDL	BDL	-
0.0006 ± 0.004	0.00 (0.00-0.04)	4.4	n.s. / n.s.
5.95 ± 4.88	4.61 (0.01-40.16)	100	n.s. / -

40%). Adult female turtles from Cape Verde showed higher concentrations and frequency of detection of acenaphthene, fluorene, fluoranthrene, and pyrene than turtles from the Canary Islands. Furthermore, although benzo [a] anthracene was detected at similar concentrations in both populations, this compound was more frequently detected in turtles from Cape Verde (**Table 10**). Total burden of PAHs ( $\Sigma$ PAHs) were similar in both populations: median values of 5.5 ng/ml for turtles from Canary Islands, and 4.6 ng/ml for turtles from Cape Verde.

PAH profile calculated as the percentage of each group of PAHs with respect to total PAHs burden was similar between the two populations (Figure 9). However, blood concentrations of tetra-cyclic PAHs were higher in turtles from Cape Verde than the turtles from the Canary Islands ( $p < 0.001$ ) (**Table 10**).



**Figure 9.** PAHs profiles of turtles stranded in the Canary Islands and nesting turtles from the Cape Verde archipelago. Bars represent the frequency of detection in percentage.

## Inter-year comparison of PAHs concentrations

As shown in **Table 11** there was a clear temporal trend in the levels of contamination by PAHs among the sea turtles stranded on the coasts of the Canary Islands between the different sampling years, being the total burden of PAHs much higher in 2010 and 2009 than in 2008 and 2007.

Some individual PAH differences between 2009 and 2010 were also observed in the turtles from Cape Verde. However, we did not find any significant difference in the total burden of PAHs in these turtles between 2009 and 2010 (**Table 12**). In addition, only for more recent years (2009 and 2010), turtles from the Canary Islands showed higher levels of  $\Sigma$ PAHs (in both years) than turtles from Cape Verde (9 vs. 5 ng/ml approximately).

## Differences of PAHs concentrations among stranding causes and size

The mean concentration of fluoranthene in the loggerheads stranded in the Canary Islands due to crude oil ingestion ( $n = 4$ ) was much higher ( $0.41 \pm 0.47$ ;  $p < 0.01$ ) than the mean observed for the rest of turtles stranded for other reasons ( $0.027 \pm 0.17$ ). No other differences were observed between PAHs when comparing the cause of stranding.

Among the turtles stranded in the Canary Islands, negative correlations between size (CCL) and concentrations of acenaphthene ( $r = -0.206$ ;  $p < 0.01$ ), phenanthrene ( $r = -0.271$ ;  $p = 0.001$ ), and  $\Sigma$ PAHs ( $r = -0.259$ ;  $p = 0.001$ ) were evident. We did not observe any significant correlation between PAHs levels and CCL in loggerheads from Cape Verde.

## Discussion

### PAHs profile

The present study represents the first report of contamination by PAHs in sea turtles from the Canary Islands and the Cape Verde archipelago. Previous publications reporting PAH concentrations in tissues of marine turtles from other geographical areas are scarce (Godley et al., 1998a; Hall et al., 1983). As far as we know, the present survey is the study with the highest number of loggerhead turtles analyzed; furthermore, it is the first one in which plasma samples (not tissues) from loggerhead turtles were used to monitor the environmental presence of petroleum-derivative chemicals.

Our study shows that the overall pattern of contamination by PAHs was similar in turtles from the Canary Islands and the Cape Verde archipelago. Phenanthrene was the PAH most frequently detected and at the highest concentration in plasma of loggerhead turtles from both populations. This compound is an important component of crude oil, and dominates weathered oil after the volatile naphthalenes have been lost (Kennedy and Farrel, 2005). Compared to other PAHs, it is considered relatively less toxic, with a toxic equivalent factor of 0.001 relative to benzo [a] pyrene (Nisbet and LaGoy, 1992). However, the ubiquitous distribution of phenanthrene in the aquatic environment, and its tendency for accumulation within organisms, results in the potential for deleterious effects.

It is remarkable that the low-molecular-weight-PAHs (di- and tri-cyclic PAHs) were the most frequently detected in both populations. Low-molecular-weight-PAHs are the primary constituents of natural petroleum seeps, rather than urban sources of PAHs (Kannan and Perrotta, 2008). Thus, the predominance of di- and tri-cyclic PAHs in our results suggests petrogenic sources.

**Table 11.** PAH and ΣPAH concentrations (ng/ml) in plasma of juvenile turtles from the Canary Islands (2007-2010).

	2007 (n = 41)		2008 (n = 45)	
	Mean ± SD	Median (range)	Mean ± SD	Median (range)
<i>Naphtalene</i> <sup>bce</sup>	1.13 ± 1.01	1.18 (0.00-3.61)	1.21 ± 1.55	0.00 (0.00-4.75)
<i>Acenaphtene</i> <sup>a*</sup>	n.d.	n.d.	0.034 ± 0.12	0.00 (0.00-0.73)
<i>Fluorene</i> <sup>e</sup>	0.04 ± 0.14	0.00 (0.00-0.83)	0.12 ± 0.31	0.00 (0.00-1.57)
<i>Anthracene</i>	n.d.	n.d.	0.045 ± 0.31	0.00 (0.00-2.10)
<i>Phenanthrene</i> <sup>ab*cd</sup>	1.37 ± 1.38	1.02 (0.00-6.91)	4.06 ± 2.46	3.78 (0.00-10.97)
<i>Fluoranthrene</i> <sup>de</sup>	0.002 ± 0.008	0.00 (0.00-0.04)	n.d.	n.d.
<i>Pyrene</i>	0.009 ± 0.06	0.00 (0.00-0.40)	0.04 ± 0.21	0.00 (0.00-1.12)
<i>Benzo [a] anthracene</i> <sup>ab*ce</sup>	0.01 ± 0.017	0.01 (0.00-0.07)	0.0046 ± 0.011	0.00 (0.00-0.06)
<i>Chrysene</i> <sup>b*ce</sup>	0.0068 ± 0.012	0.00 (0.00-0.05)	0.0037 ± 0.011	0.00 (0.00-0.04)
<i>Indeno [1,2,3-c,d] pyrene</i>	0.0002 ± 0.015	0.00 (0.00-0.01)	n.d.	n.d.
<i>Dibenza [a,h] anthracene</i>	0.001 ± 0.004	0.00 (0.00-0.02)	0.0009 ± 0.006	0.00 (0.00-0.04)
<b>ΣPAHs</b> <sup>ab*cd</sup>	1.58 ± 2.21	1.77 (0.01-10.13)	5.45 ± 3.11	5.19 (0.78-16.61)

n.d.: non detectable.

<sup>a</sup> P < 0.05 comparing 2007 and 2008.

<sup>b</sup> P < 0.001 comparing 2007 and 2009.

<sup>c</sup> P < 0.05 comparing 2008 and 2009.

<sup>d</sup> P < 0.01 comparing 2008 and 2010.

<sup>e</sup> P < 0.05 comparing 2009 and 2010.

\*P < 0.05 comparing 2007 and 2010.

**Table 12.** PAH and ΣPAH concentrations (ng/ml) in plasma of adult turtles from the Cape Verde (2009-2010).

	2009 (n = 63)		2010 (n = 142)	
	Mean ± SD	Median (range)	Mean ± SD	Median (range)
<i>Naphtalene</i> <sup>abc</sup>	1.69 ± 1.55	1.40 (0.00-5.93)	0.50 ± 0.96	0.00 (0.00-4.99)
<i>Acenaphtene</i> <sup>bc</sup>	0.68 ± 0.85	0.50 (0.00-4.77)	0.57 ± 0.50	0.44 (0.00-2.94)
<i>Fluorene</i> <sup>ac</sup>	0.14 ± 0.68	0.00 (0.00-4.76)	0.32 ± 0.28	0.24 (0.00-1.39)
<i>Anthracene</i>	0.10 ± 0.81	0.00 (0.00-6.48)	0.007 ± 0.08	0.00 (0.00-0.97)
<i>Phenanthrene</i> <sup>abc</sup>	3.27 ± 4.01	2.45 (0.00-32.87)	4.24 ± 3.52	2.94 (0.00-15.52)
<i>Fluoranthrene</i> <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	0.13 ± 0.21	0.00 (0.00-1.24)
<i>Pyrene</i> <sup>a</sup>	0.02 ± 0.10	0.00 (0.00-0.54)	0.18 ± 0.46	0.00 (0.00-3.60)
<i>Benzo [a] anthracene</i> <sup>abc</sup>	0.007 ± 0.017	0.02 (0.00-0.08)	0.005 ± 0.007	0.003 (0.00-0.03)
<i>Chrysene</i> <sup>a</sup>	0.002 ± 0.01	0.00 (0.00-0.06)	0.002 ± 0.006	0.00 (0.00-0.03)
<i>Indeno [1,2,3-c,d] pyrene</i>	n.d.	n.d.	0.0001 ± 0.001	0.00 (0.00-0.01)
<i>Dibenza [a,h] anthracene</i>	0.001 ± 0.005	0.00 (0.00-0.04)	0.0005 ± 0.003	0.00 (0.00-0.02)
<b>ΣPAHs</b> <sup>bc</sup>	5.92 ± 5.43	4.54 (1.89-40.16)	5.96 ± 4.64	4.70 (0.01-20.92)

n.d.: non detectable.

<sup>a</sup> P < 0.01 comparing 2009 and 2010 of plasma sample of turtles from Cape Verde.

<sup>b</sup> P < 0.05 comparing 2009 of plasma samples of turtles from the Canary Islands and Cape Verde.

<sup>c</sup> P < 0.001 comparing 2010 of plasma samples of turtles from the Canary Islands and Cape Verde.

2009 (n = 46)		2010 (n = 30)	
Mean ± SD	Median (range)	Mean ± SD	Median (range)
3.54 ± 2.45	3.08 (0.00-10.29)	1.53 ± 1.41	1.75 (0.00-3.61)
0.047 ± 0.18	0.00 (0.00-0.92)	0.037 ± 0.10	0.00 (0.00-0.41)
0.07 ± 0.27	0.00 (0.00-1.39)	0.32 ± 0.57	0.00 (0.00-1.73)
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5.40 ± 2.77	5.33 (1.05-15.24)	6.95 ± 5.11	6.39 (1.05-23.45)
n.d.	n.d.	0.19 ± 0.40	0.00 (0.00-1.61)
0.043 ± 0.21	0.00 (0.00-1.11)	0.11 ± 0.36	0.00 (0.00-1.52)
n.d.	n.d.	0.001 ± 0.003	0.00 (0.00-0.01)
n.d.	n.d.	0.002 ± 0.066	0.00 (0.00-0.03)
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.0007 ± 0.004	0.00 (0.00-0.03)	0.0007 ± 0.004	0.00 (0.00-0.01)
9.10 ± 4.55	9.31 (2.80-25.83)	9.15 ± 6.50	7.54 (1.09-29.46)

## Inter-year and geographical differences of PAHs concentrations

The temporal differences in  $\Sigma$ PAH concentrations within the group of turtles stranded in the Canary Islands seems to suggest an increasing level of contamination in sea waters around this archipelago. In particular,  $\Sigma$ PAHs were significantly higher in juvenile loggerhead turtles stranded in 2009 and 2010 vs. previous years ( $p < 0.001$ ). Temporal differences in PAHs burden have been documented in marine vertebrates mainly after local accidental discharges of petroleum into marine ecosystems (Marsili et al., 2001; Perez et al., 2008). No accidental oil spills have been reported in the Canary Islands and Cape Verde recently. However, there is intensive traffic of large oil tankers bound for the Persian Gulf in the waters of the Canary Islands (estimated 1,500 vessels per year), and there is illegal, uncontrolled spillage of oil residues (IMO 2007).

The fact that, the Canary Islands are a more developed region than Cape Verde Archipelago, could explain the differences detected in PAHs levels in 2009 and 2010 between both populations.

## Bioaccumulation process and effects of PAHs

The lack of differences between the levels of contaminations within the different stranding causes, and specially stranded turtles by malnutrition reason, suggest that PAHs are not accumulated throughout their life. In fact, many higher trophic-level aquatic organisms can metabolize PAHs (Roscales et al., 2011). It is generally assumed that biomagnification in aquatic organisms and in marine food webs is insignificant (Nakata et al., 2003; Perugini et al., 2007). Besides, our results showing that larger turtles had lower  $\Sigma$ PAH concentrations (at least for turtles in the Canary Islands) also suggest that bioaccumulation processes for PAHs do not seem to occur. However, these results should be taken with caution because larger turtles were sampled principally in 2007 (year with the lowest levels of PAHs). In any case, our results indicate that PAHs concentrations in sea turtles seem to be directly related to recent exposure to waters or food contaminated by PAHs.

Although the overall level of contamination by PAHs was similar between both populations, a number of findings demonstrate the existence of some relevant differences in the contamination by PAHs among the turtles from the Canary Islands and Cape Verde. These differences seem to be due to a different degree of contamination between both archipelagos and not to difference in eating habits among turtles.

The direct and indirect effects of oil are well documented in seabirds (Leighton, 1993; Newman et al., 1999) and marine mammals (Geraci, 1990; Martineau et al., 2002). Several studies evaluated the effects of oil on sea turtles through direct application of crude oil (Lutcavage et al., 1997b; Lutz et al., 1986), demonstrating that sea turtles are vulnerable to the effects of oil at all life stages. However, data on the chronic toxicity of oil and PAHs in sea turtles are very scarce.

PAHs are acutely toxic to aquatic organisms at concentrations of 0.2 to 10  $\mu\text{g/g}$ , while deleterious sublethal responses are sometimes observed in aquatic organisms in the range of 0.005 to 0.01  $\mu\text{g/g}$  (Neff, 1985). Chronic exposure may not be lethal by itself, but it may impair a turtle's overall fitness so that it is less able to withstand other stressors and may ultimately cause more harm to populations. Hutchinson and Simmonds (1992) suggested a link between low-level chronic exposure to contaminants such as oil, and the occurrence of cutaneous fibropapillomatosis in sea turtles. In fact, the most important long-term toxic effect resulting from exposure to PAHs is cancer (Collins et al., 1998). In any case, it has to be taken into account that compounds produced by metabolism of PAHs may accumulate and induce toxic effects (Brunstrom et al., 1991). Further studies are necessary to evaluate the long-term deleterious effects exerted by PAHs exposure in sea turtles.



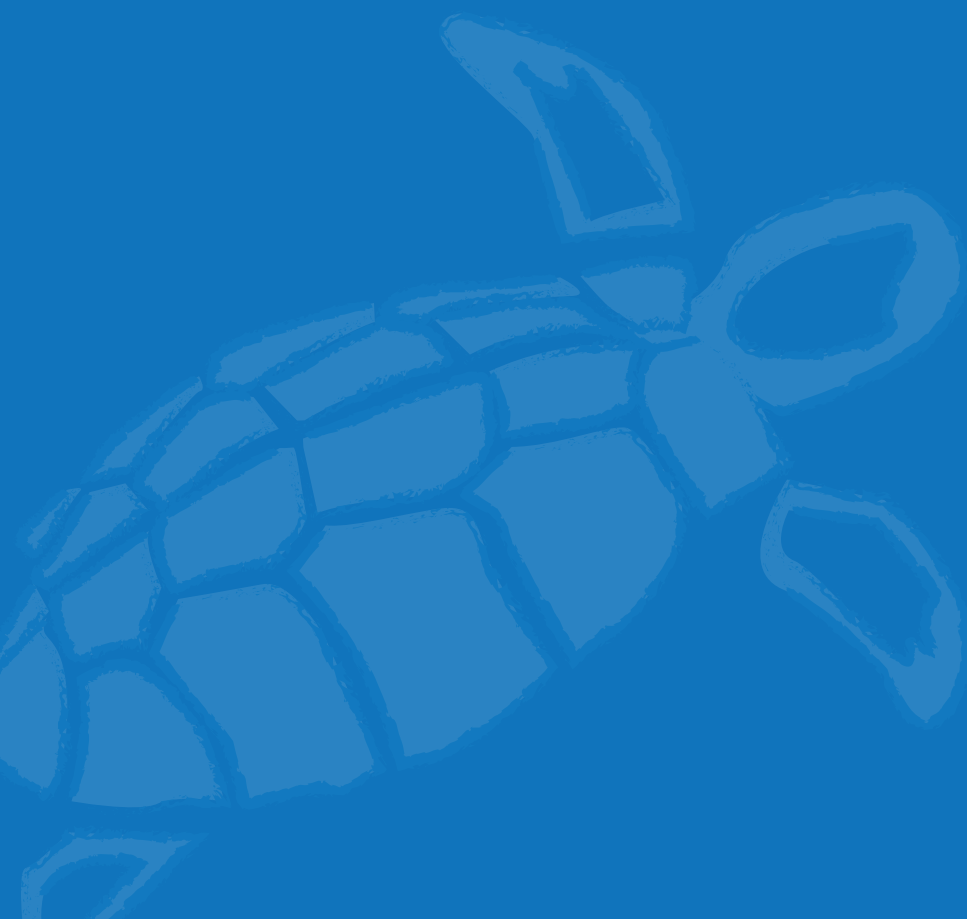
# Conclusions

1. This study is the first reference of baseline concentrations for PAHs in loggerhead sea turtles from two different populations of the West Africa coast, demonstrating that both populations are exposed to PAHs.
2. The fingerprint of the 16 PAHs showed that phenanthrene was the most ubiquitous compound.
3. Although our findings report significant differences in several PAHs concentrations among the populations studied, the predominance of di- and tri-cyclic PAHs in both populations suggests petrogenic origin rather than urban sources of PAHs.
4. The temporal significant differences in  $\Sigma$ PAH concentrations within the turtles from the Canary Islands seem to suggest an increasing level of contamination in this area over the last few years.
5. We stress the importance of blood samples as biological material useful to evaluate environmental exposure of sea turtles to PAHs.



# CAPÍTULO V

Heavy metals and essential elements values in blood of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from a nesting colony of Boavista Island (Cape Verde, West Africa)



**CAPÍTULO V**

**Heavy metals and essential elements values in blood of loggerhead sea turtles**

**(*Caretta caretta*) from a nesting colony of Boavista Island**

**(Cape Verde, West Africa)**.....193

ABSTRACT .....195

INTRODUCTION .....196

MATERIAL AND METHODS (Animal data).....197

RESULTS .....197

DISCUSSION .....202

CONCLUSIONS .....207

## Heavy metals and essential elements values in blood of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from a nesting colony of Boavista Island (Cape Verde, West Africa)

### Abstract

A large number of healthy, nesting loggerhead sea turtles ( $n = 201$ ) were sampled in order to establish the baseline levels of 11 inorganic elements (Cu, Mn, Pb, Zn, Cd, Ni, Cr, As, Al, Hg, and Se). Almost all the samples showed detectable levels of the 11 elements, being Zn and Se those that reached the highest concentrations (median values as high as 6.05 and 2.28  $\mu\text{g/g}$ , respectively). Other essential elements, such as Cu, Cr, and Mn were also present, but at lower levels (0.50, 0.08, and 0.02  $\mu\text{g/g}$ , respectively). The median concentrations of the most toxic compounds As, Cd, Pb, and Hg were relatively low (0.38, 0.24, 0.06, and 0.03  $\mu\text{g/g}$ , respectively). Having into account the large number of animals involved in this study we can assure that these figures represent the basal levels of these inorganic elements in healthy nesting loggerhead sea turtles, and, as a consequence, these values may be used as reference in future studies involving such population. Additionally, we also determined hematological and biochemical parameters in a subsample of 50 turtles to evaluate potential effects of these contaminants on clinical parameters and several associations were found. Our study reinforces the utility of blood as an excellent sample for the monitoring of levels of contamination by inorganic elements and their adverse effects on blood parameters in sea turtles.

# Introduction

The pollution of the oceans represents a problem of great impact to the health of wildlife, humans and ecosystems (Wilcox and Aguirre, 2004). Among the environmental contaminants of great relevance due to their toxicity are those of chemical origin such as pesticides, halogenated pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons and some inorganic elements (Camacho et al., 2012; Camacho et al., 2013b; Monagas et al., 2008; Orós et al., 2009; Torrent et al., 2004). Even though some inorganic elements are natural components of rocks and soil, which find their way into the marine environment as a consequence of weathering and erosion, increasing quantities of these elements could be released into the sea due to industrialization or other unnatural processes altering the natural biological equilibrium (Haynes and Johnson, 2000). In particular heavy metals are very relevant in ecotoxicology because of their persistence and potential toxicity to all living organisms (Storelli et al., 2005). Heavy metals and some metalloids are non easily biodegradable through bacterial metabolic pathways, and as a consequence suffer biomagnification processes through the food web, and species placed in higher trophic levels are at risk of being exposed to high levels of these pollutants. Recently, a number of studies have demonstrated that heavy metals may induce deleterious effects on immune system of sea turtles (Day et al., 2007; Maffucci et al., 2005). Thus, anthropogenic sources of heavy metals seem to be a threat to the populations of marine turtles all over the world (Maffucci et al., 2005). Besides this, essential inorganic elements can also be toxic to biota above certain exposure thresholds (O'Shea and Geraci, 1999), and may cause adverse effects on health of the organisms at the top of the marine food-chain (Cardellicchio et al., 2000), particularly on those long living species such as sea turtles which have the potential to accumulate these elements (Anan et al., 2001; Caurant et al., 1999). Hence, some concern exists regarding possible adverse effects of anthropogenically concentrated essential elements. This is the case for selenium, as levels of this element in marine environment have been steadily increasing due to its expanding use in the manufacture of superconductors and other electronic devices. Short- and long-term exposure of sea turtles to inorganic pollutants could increase the incidence of diseases and affect various functional processes including reproduction, growth and development (Aguirre et al., 1994; Bernanke and Kohler, 2009). As a consequence of the aforementioned circumstances, the effects of marine pollution are currently listed among the top 20 research questions for sea turtle conservation (Hamann et al., 2010).

All species of sea turtles are regarded as endangered and are listed in Appendix I of the Convention of International Trade in Endangered Species (CITES) and in the Red List of the International Union for Conservation of Nature (IUCN 2012). In Cape Verde, five of the seven marine species of turtles can be found (*Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea*, *Dermochelys coriacea*, *Chelonia mydas* and *Eretmochelys imbricata*), being loggerhead sea turtle the most common species and the only one that nests along the coasts of these islands. In fact, the population of

loggerheads of Cape Verde is considered the second largest in the Atlantic and the third in the world (Marco et al., 2012). Because almost the 90% of the nesting of Cape Verde loggerheads occurs in Boavista Island, continuous conservation efforts have been conducted in this area to protect this species (López Jurado et al., 2000b). In this sense, Turtle Conservation Program led by Natura 2000 and Cape Verde Government has been operating in this region since 1999.

Having into account that sea turtles are of increasing interest as potential bioindicators of the pollution in marine ecosystems (Andreani et al., 2008), an assessment of the environmental impact of the inorganic pollutants on sea turtle health is mandatory. With the exception of Hg, Cd, Zn, and Cu, few studies have been developed to know basal levels of inorganic pollutants in sea turtles and to evaluate their adverse effects on the health of these animals. To fill in this gap we conducted this study that evaluated concentrations of inorganic elements (including heavy metals and essential elements) in female nesting loggerhead sea turtles from Cape Verde, with the goal of establishing which are the baseline levels and also to determine whether these compounds were present in concentrations that could have a real impact on the health status of the turtles.

## Material and methods

### Animal data

During summer of 2010 and 2011 blood samples (n= 201) were collected from nesting female loggerhead turtles on Ervatao and Punta Cosme beaches. These beaches are monitored regularly and nesting loggerhead females encountered are tagged with an internal permanent marker (Passive Integrated Transponder [PIT] tags). A complete visual physical examination was performed and their size was evaluated using the curve carapace length (CCL). According a dichotomy observed among sexually mature females of loggerhead sea turtles from Boavista (Hawkes et al., 2006), we established two groups of turtles: large adult females (n = 15) (forage primarily in neritic habitats) and smaller adult females (n = 186) (forage primarily in oceanic habitats).

## Results

### Blood levels of inorganic elements and biometric data of nesting turtles

**Table 13** summarizes the concentrations of inorganic elements found in blood samples from nesting loggerhead turtles. All the samples analyzed showed values above the limit of detection (LOD) for all the inorganic elements evaluated, with the exception of one blood sample which showed levels of mercury below

the LOD. There were huge differences in the blood concentrations among the different inorganic elements evaluated. Thus, while the elements found at the highest concentration were essential inorganic elements, such as Zinc, which reached median values higher than 6 µg/g, and Selenium which showed median values near to 2.3 µg/g, the most toxic heavy metals, such as lead and mercury, were among the inorganic elements found at the lowest levels (0.06 and 0.03 µg/g, respectively). The rank order of concentration in blood of the elements evaluated was as follow: Zinc > Se > Al > Cu > As > Cd > Ni < Cr > Pb > Hg > Mn. Nevertheless, Copper was the element that reached the highest blood levels in a nesting loggerhead sea turtle (116.87 µg/g).

As shown in **Table 14**, there were a number of significant relationships among the inorganic elements evaluated throughout this work. For example, blood levels of selenium were positively associated with blood levels of Cu, Pb, Zn, Ni, Cr, As, and Al, and they were negatively related to blood levels of Mn, and Cd. On the contrary levels of arsenic in blood from nesting loggerhead sea turtles were only positively correlated with levels of Pb and Se. Interestingly, blood lead levels were associated negatively to the most toxic compounds Cd and Hg.

We used the CCL to evaluate growth. Large turtles (n = 15) showed a mean and standard deviation CCL of  $95.51 \pm 3.96$  and small turtles (normal size, n = 186) of  $82.21 \pm 2.99$ . Among all the elements analyzed, we only observed significant differences for Mn and Pb elements and both groups of turtles. Higher median

**Table 14.** Spearman correlations between heavy metals and essential metals in blood of the loggerhead turtles (*Caretta caretta*).

Elements	Cu	Mn	Pb	Zn	Cd
Cu			0.577**	0.422**	-0.266**
Mn				-0.256**	0.529**
Pb	0.577**			0.473**	-0.307**
Zn	0.422**	-0.256**	0.473**		-0.287**
Cd	-0.266**	0.529**	-0.307**	-0.287**	
Ni	0.234*	0.163			
Cr	0.326**		0.271**		-0.323**
As			0.150		
Al	0.187*	-0.177	0.304**	0.373**	-0.518**
Se	0.541**	-0.237*	0.576**	0.452**	-0.530**
Hg		0.164	-0.204*	-0.211*	

$P < 0.001$ \*\*;  $P < 0.01$ ; \*, others =  $P$



Mn concentrations were observed in large vs. smaller turtles (0.03 vs. 0.01 µg/g;  $p < 0.05$ ). However, higher median Pb concentrations were found in smaller vs. large turtles (0.06 vs. 0.05 µg/g;  $p < 0.05$ ). Furthermore, we found a positive correlation between size and Ni ( $r = + 0.156$ ;  $p < 0.05$ ).

**Table 13.** Concentration (µg/g) of heavy metals and metalloids in blood of adult female loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Boavista, Cape Verde (n = 201).

Elements	Mean ± SD	Median (Range)
Cu	1.27 ± 8.46	0.50 (0.035 – 116.87)
Mn	0.03 ± 0.03	0.02 (0.008 -0.4)
Pb	0.06 ± 0.02	0.06 (0.01 – 0.1)
Zn	4.97 ± 2.9	6.05 (0.41 – 17.95)
Cd	2.9 ± 0.25	0.24 (0.01 – 1.06)
Ni	1.41 ± 6.66	0.13 (0.001 – 65.89)
Cr	0.26 ± 1.02	0.08 (0.01 – 10.7)
As	0.58 ± 0.95	0.38 (0.008 – 11)
Al	1.07 ± 1.21	0.79 (0.003 – 7.95)
Hg	0.04 ± 0.04	0.03 (< LOD – 0.32)*
Se	2.53 ± 2.21	2.28 (0.02 – 9.9)

\* Only one turtle showed Hg concentrations below of limit of detection (LOD). The rest of elements were detected in 100% of samples.

Ni	Cr	As	Al	Se	Hg
0.234*	0.326**		0.187**	0.541**	
0.163			-0.177	-0.237*	0.164
	0.271**	0.150	0.304**	0.576**	-0.204*
			0.373**	0.452**	-0.211*
	-0.323**		-0.518**	-0.530**	
	0.670**		-0.216*	0.329**	0.230*
0.670**			0.179	0.473**	0.169
				0.224*	
-0.216	0.179			0.329**	
0.329**	0.473**	0.224*	0.329**		
0.230*	0.169				

**Table 15.** Hematological and biochemical parameters of adult nesting loggerhead sea turtles (small vs. large turtles).

	Small turtles (n = 42)	Large turtles (n = 8)
	Mean ± SD (Range)	Mean ± SD (Range)
<b>Hematology</b>		
PCV (%)	36.98 ± 5.12 (21-48)	36.62 ± 6.72 (29.5-47)
RBC (x 10 <sup>10</sup> cells/L)	40.17 ± 8.17 (26-60)	42 ± 10.42 (32-59)
WBCs (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	4.9 ± 1.93 (1.55-12.6)	4.21 ± 1.65 (1.25-5.9)
Thrombocyte estimate (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	17.07 ± 3.6 ( 9.02-26)	16.25 ± 16 (10-24)
Heterophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	3.7 ± 8.5 (0.93-11.5)	3.25 ± 5.76 (0.9-5.07)
Eosinophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.83 ± 7.76 (0.06-4.5)	0.54 ± 7.16 (0.02-1.36)
Lymphocytes (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.15 ± 2.4 (0.00-1.4)	0.22 ± 4.58 (0.04-0.5)
Monocytes (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.18 ± 2.06 (0.00-1.13)	0.19 ± 2.6 (0.00-0.5)
Basophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.007 ± 0.41 (0-0.02)	0.01 ± (0.00-0.006)
<b>Biochemistry</b>		
Total protein (g/dL)	4.62 ± 0.58 (3.5-6.2)	4.56 ± 0.64 (3.1-5)
Albumin (g/dL)	1.66 ± 0.22 (1.3-2.3)	1.6 ± 0.3 (1.1-2)
Globulin (g/dL)	2.96 ± 0.41 (2.2-4.1)	2.97 ± 0.43 (2-3.4)
Alb:Glo ratio	0.57 ± 0.07 (0.4-0.72)	0.54 ± 0.08 (0.43-0.7)
Glucose (mg/dL)	88 ± 22.92 (38-132)	83.5 ± 30.55 (47-136)
Creatinine (mg/dL)	0.39 ± 0.07 (0.2-0.5)	0.34 ± 0.07 (0.3-0.5)
Uric acid (mg/dL)	0.85 ± 0.34 (0.1-1.9)	0.66 ± 0.08 (0.37-0.88)
Urea (mg/dL)	31.64 ± 7.94 (14-56)	29.5 ± 9.5 (23-48)
Total bilirubin (mg/dL)	0.16 ± 0.02 (0.12-0.21)	0.14 ± 0.02 (0.11-0.19)
Total cholesterol (mg/dL)	342 ± 91.15 (194-584)	307.4 ± 100.8 (177-506)
Triglyceride (mg/dL)	971.43 ± 339.53 (266-1667)	1008.4 ± 264.2 (663-1327)
ALT (UI/L)	2.14 ± 3.34 (1-22)	2.4 ± 2.3 (1-6)
AST (UI/L)	220.14 ± 67 (87-382)	228 ± 72.85 (131-372)
ALP (UI/L)	16.74 ± 7.4 (9-50)	11.4 ± 2.7 (9-16)
LDH (UI/L)	129.38 ± 111 (2-587)	162.5 ± 215.5 (1-671)
GGT (UI/L)	0.88 ± 0.4 (0.5-2)	0.94 ± 0.5 (0.5-2)
CPK (UI/L)	886.8 ± 1371 (128-8201)	689.9 ± 572 (153-1919)
Amylase (UI/L)	558.8 ± 187 (83-1002)	548 ± 235.1 (303-963)
Lipase (UI/L)	21.88 ± 14.6 (2-80)	23.9 ± 20.26 (4-60)
Sodium (mmol/L)	150.05 ± 3.06 (140-155)	143.25 ± 11.51 (117-153)
Potassium (mmol/L)	4.13 ± 0.3 (3.5-4.8)	3.97 ± 0.58 (3.3-5.1)
Na:K ratio	36.46 ± 2.33 (32.08-42.57)	36.43 ± 3.94 (30-42.4)
Chloride (mmol/L)	108.7 ± 91.15 (194-584)	104.55 ± 8.93 (85-113)
Calcium (mg/dL)	13.9 ± 4.05 (1.2-20.6)	11.06 ± 4.6 (1.3-15.8)
Phosphorous (mg/dL)	8.52 ± 1.87 (5-15.02)	6.8 ± 1.04 (5.2-8.1)
Magnesium (mg/dL)	7.14 ± 1.13 (5.3-11.5)	5.92 ± 0.63 (4.52-6.41)

## Clinical Parameters

Summary statistics for blood chemistry and hematological parameters for neritic and oceanic individuals are presented in **Table 15**. A similar account of these parameters from our large data set has been published previously by our group (Camacho et al. 2013). In addition, in **Table 16** we showed several weak but significant correlations between elements analyzed and health parameters.

In the present study, the essential elements Cr, Cu, and Zn, and the clearly toxic heavy metal Hg did not show any association with clinical parameters. However, we observed significant negative correlation between white blood cells count (WBC) and blood levels of Ni, As and Se. Similarly, red blood cells count (RBC) was negatively associated to blood levels of Cd, and blood Al levels were inversely related to the number of heterophils in blood samples from nesting loggerhead sea turtles.

Regarding biochemical parameters evaluated, it has drawn our attention that uric acid levels appeared to be inversely related to blood levels of Pb, Ni, and As, and that turtles with higher concentrations of Mn had lower concentrations of creatin kinase (CPK). Similarly, blood Pb levels seemed to affect negatively to Albumin/Globulin ratio (A/G), and levels of Al in blood of nesting loggerhead sea turtles were inversely associated with plasmatic level of potassium and phosphorus. On the contrary, plasma amylase levels were positively associated to levels of Al in blood.

**Table 16.** Statistically significant correlations of heavy metals and metalloid and health parameters of adult nesting loggerhead sea turtles from Cape Verde (n = 50). Number in cells indicates the positive or negative correlation.

Health Parameter	Elements						
	Mn	Pb	Cd	Ni	As	Al	Se
RBC			-0.400*				
WBC				-0.310	-0.286		-0.341
Heterophils						-0.294	
Alb/Glob		-0.325					
Uric acid		-0.287		-0.333	-0.361		
Amylase						0.310	
CPK	-0.325						
Potassium						-0.411*	
Phosphorous						-0.491**	

\*\* =  $P < 0.001$ ; \* =  $P < 0.01$ ; others correlations =  $P < 0.05$

## Discussion

Inorganic elements present in marine animals may be originated from natural or anthropogenic sources, although for most of the trace elements, the emissions from anthropogenic sources are estimated to be large compared with natural fluxes (Nriagu, 1989). In this sense it is considered that human activities have scattered huge amounts of trace elements, mainly the most toxic heavy metals, but also other inorganic essential elements, in the marine environment (Anan et al., 2001; Nriagu and Pacyna, 1988). Hence, some concern exists regarding possible adverse effects of anthropogenically derived inorganic elements (including those considered as essential elements), although little is known about their toxic action on wildlife. An assessment of the environmental impact of these trace elements requires baseline data. However, studies designed to characterize the deleterious effects of inorganic elements in wildlife in the marine environment are scarce except for the most toxic elements such as Hg, Cd, and Pb. Due to the increased levels of contamination in marine ecosystems toxicological and baseline studies of other trace elements are mandatory. In addition, data on the influence of gender, growth, and diet on the accumulation of inorganic elements in marine animals and their transfer through food chain also are scarce.

### Levels of inorganic elements

The use of blood to assess levels of exposure to inorganic elements is an attractive option for studies on wildlife health because blood can be non-lethally collected and allows for the simultaneous determination of environmental anthropogenic pollutants and clinical parameters. In this sense, this type of studies allows to evaluate the influence of environmental pollution on health of sea turtles reducing costs and time. This study represents the large published research investigating baselines levels of a number of inorganic pollutants and essential elements in nesting sea turtles and their potential effects on hematological and biochemical parameters of nesting sea turtles.

It has been reported differences in the levels of contaminants among the different species of sea turtles in relation with an inter-specific difference in diet (Andreani et al., 2008; Caurant et al., 1999; Gardner et al., 2006; Godley et al., 1999; Sakai et al., 2000; Suzuki et al., 2012). In fact, loggerhead sea turtles seem to have larger amounts of non-essential elements than other species (Suzuki et al., 2012). However, within each species, diet content also varies depending on the location of the turtle. Therefore, the metal concentrations in sea turtles would reflect the contamination of their foraging grounds, which would be dependent on regional and local sources of these chemicals. As a consequence, the most interesting comparisons should be those made with other previous studies on sea turtle from the same region. However, due to the lack of previous studies in the Macaronesian region, we have had to compare our results with those published in loggerhead sea turtles and others species from different regions of the world (see **Table 17**).

Because no reliable age determination method exists for sea turtles (Bjørndal et al., 2001), we used the CCL to evaluate growth-related variations in the levels of trace elements. Although we analyzed the largest sample of loggerhead turtles to date, we did not detect any clear trends, the only exception being Ni. The differences found between the two groups of turtles (normal vs. large) could be due to the different type of eating habit among groups (oceanic vs. neritic, respectively) (Eder et al., 2012; Hawkes et al., 2006). As stated previously, statistically significant relationships were detected in metal concentrations with sea turtle size (Anan et al., 2001; Barbieri, 2009a; Day et al., 2005; Gardner et al., 2006; Gordon et al., 1998; Sakai et al., 2000). Furthermore, it has reported that the correlation between trace element concentrations and growth is species-specific in sea turtles (Anan et al., 2001; Ikonopoulou et al., 2011; Kampalath et al., 2006). Most of the turtles analyzed in the present study were classified as normal size. We agree with Maffucci et al. (2005) that the absence of correlation between size and most of the metals is because our largest group of turtles studied was relatively homogenous in size (normal group, range CCL: 75-89 cm) and age (adult nesting female).

Several studies have been reported levels of trace metals in different tissues and eggs in sea turtles (Andreani et al., 2008; Franzellitti et al., 2004; Frias-Espericueta et al., 2006; García-Fernández et al., 2009; Maffucci et al., 2005; Torrent et al., 2004). However, there are few studies evaluating these contaminants on blood in these reptiles (**see Table 17**). The average levels of inorganic elements found in the loggerhead sea turtle from Cape Verde were generally lower than those reported in loggerhead turtles from Mexico and West Mediterranean Sea (Jerez et al., 2010; Ley-Quinonez et al., 2011), but higher (especially in the most toxic elements, Hg, Pb, and As) than those reported in Japan (Suzuki et al., 2012).

Our results agree with those previously published in the sense that Zn was the inorganic element detected at highest concentrations in blood (Jerez et al., 2010) and in other tissues (Jerez et al., 2010; Sakai et al., 2000; Torrent et al., 2004). However, the levels detected in the present study were lower than the previously reported (Guirlet et al., 2008; Jerez et al., 2010; Ley-Quinonez et al., 2011; Páez-Osuna et al., 2010b; van de Merwe et al., 2010; Wang, 2005), perhaps the fact that our study focused in nesting sea turtles may explain this result. The rest of essential elements analyzed were also detected at similar or lower levels than those reported previously (**see Table 17**). Nevertheless, it has to be taken into account that bone and carapace are known to be important tissues for accumulation of a number of inorganic elements, i.e. Mn, Pb, and Zn in loggerhead turtles (Sakai et al., 2000), and that these tissues were not available in the present study.

Essential metals (Cu, Cr, Mn, Ni, Se and Zn) play essential roles in tissue metabolism and growth. However, the negative effects of some of these elements it is little known. Thus, it has been suggested that Se present in the eggs could be toxic for the embryo (Lam et al., 2006).

**Table 17.** Sea turtles blood heavy metals and essential elements concentrations ( $\mu\text{g/g}$ ) previously published work.

<i>Location</i>	<b>Cu</b>	<b>Mn</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>	<b>Cd</b>
<b>Loggerhead sea turtle (<i>Caretta caretta</i>)</b>					
<i>Cape Verde</i>	1.27 $\pm$ 8.46	0.03 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.02	4.97 $\pm$ 2.9	0.29 $\pm$ 0.25
<i>South Carolina (USA)</i>					
<i>Mediterranean</i>			0.31 $\pm$ 0.31	7.07 $\pm$ 2.85	0.12 $\pm$ 0.21
<i>Mexico</i>	2.83 $\pm$ 0.62	0.61 $\pm$ 0.55	< 0.01	44.81 $\pm$ 17.53	1.8 $\pm$ 0.63
<i>Japan</i>	0.6 $\pm$ 0.13	0.05 $\pm$ 0.06	4.3 $\pm$ 2.82	1.8 $\pm$ 0.8	
<b>Kemp's Ridley (<i>Lepidochelys kempii</i>)</b>					
<i>Texas and Luisiana (USA)</i>	0.524		0.011	7.5	
<i>Mexico</i>	0.4 $\pm$ 0.09		0.05 $\pm$ 0.02	22.7 $\pm$ 12.6	0.015 $\pm$ 0.02
<i>Texas (USA)</i>	0.4 $\pm$ 0.12		0.03 $\pm$ 0.03	6.7 $\pm$ 4.5	0.01 $\pm$ 0.006
<i>Massachusetts, (USA)</i>	0.69 $\pm$ 0.68			2.3 $\pm$ 3.5	
<b>Leatherback turtle (<i>Dermochelys coriacea</i>)</b>					
<i>French Guiana</i>	1.34 $\pm$ 0.28		0.18 $\pm$ 0.05	11.1 $\pm$ 0.28	0.08 $\pm$ 0.03
<b>Green turtle (<i>Chelonia mydas</i>)</b>					
<i>Australia</i>	1.02 $\pm$ 0.09		0.02 $\pm$ 0.006	7.9 $\pm$ 0.7	0.03 $\pm$ 0.009
<i>Japan</i>	0.28 $\pm$ 0.13	0.04 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.6	1.36 $\pm$ 0.42	
<b>Olive Ridley turtle (<i>Lepidochelys olivacea</i>)</b>					
<i>Mexico</i>	2.28 $\pm$ 0.4		0.95 $\pm$ 0.18	58.4 $\pm$ 4.7	0.45 $\pm$ 0.2
<b>Hawksbill turtle (<i>Eretmochelys imbricata</i>)</b>					
<i>Japan</i>	0.26 $\pm$ 0.07	0.02 $\pm$ 0.03	1.8 $\pm$ 1.43	1.3 $\pm$ 0.92	
<b>Flatback turtle (<i>Natatur depressur</i>)</b>					
<i>Australia</i>	0.8			0.15	

1 Day et al., 2005; 2 Jerez et al., 2010; 3 Ley-Quiñonez et al., 2011; 4 Suzuki et al., 2012; 5 Kenyon et al., 2001; 6 Wang, 2005; 7 Innis et al., 2008; 8 Guirlet et al., 2008; 9 van de Merwe et al., 2010; 10 and 11 Paez Osuna et al., 2010a and b; 12 Ikonopoulou et al., 2012; \* Concentrations in plasma

In addition, in spite of that Cu and Mn are essential cofactors for a number of enzymes, they could also be toxic for mammals at high doses (Inoue and Makita, 1996; Romero et al., 1996). Thus, Mn exerts a number of toxic actions on central nervous system in mammals, decreasing the levels of dopamine and serotonin. Nonetheless, the potential toxicity of essential elements in sea turtles is unknown.

In our study, blood concentrations of the most toxic inorganic elements (metals) were low, reflecting a low exposure of turtles from this region to these toxic metals. However, even at low concentrations, it has been suggested that the sea turtle immune system may be more sensitive to toxic effects of metals, such as Hg, than other vertebrates (Day et al., 2007). In addition, Cd it is a well-known endocrine disrupter and even low Cd blood levels could affect animals later in life by disrupting reproductive processes (Kitana and Callard, 2008). It has to be borne in mind that mother-embryo metal transfer in sea turtles has been demonstrated (Guirlet et al., 2008; Páez-Osuna et al., 2010b). The variations in the levels of Cd and

Elements						
Ni	Cr	As	Hg	Se	Reference (n)	
1.41 ± 6.66	0.26 ± 1.02	0.58 ± 0.95	0.04 ± 0.04	2.53 ± 2.21	Present study (201)	
			0.03 ± 0.008		1 (34)	
		6.99 ± 9.28	0.02 ± 0.01	2.8 ± 1.29	2 (5)	
1.59 ± 2.42		4.09 ± 2.56	< 0.01	6.14 ± 3.6	3 (22)	
0.03 ± 0.05	0.129±0.174	1.362±0.953	0.169±0.154	0.3 ± 0.2	4* (9)	
			0.018		5 (106)	
	0.006 ± 0.009		0.07 ± 0.04		6 (18)	
	0.03 ± 0.06		0.02 ± 0.01		6 (106)	
				0.49 ± 0.06	7* (16)	
			0.011 ± 0.003	9.98 ± 0.05	8 (78)	
		4.36 ± 1.4	0.002 ± 0.0005	2.44 ± 0.63	9 (16)	
0.03 ± 0.03	0.06 ± 0.06	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.04	0.18 ± 0.2	4* (9)	
2.8 ± 1.3					10,11 (25)	
0.04 ± 0.04	0.08 ± 0.09	0.44 ± 0.5	0.04 ± 0.04	0.44 ± 0.14	4* (6)	
					12 (20)	

Hg observed in the specimens studied should change according to variations in the levels of exposure, due to the fact that turtles cannot regulate the quantities of Cd and Hg levels (Maffucci et al., 2005). But in general, the average levels of Hg found in the present study and those in other studies carried out on loggerhead sea turtles (see Table 17) are relatively low, including areas supposed to have natural mercury enrichment (Bacci, 1989; Capelli et al., 2000). Although Hg is known to be biomagnified as it rises up the marine food-chain, it does not accumulate to the same extent as in other marine vertebrates with a long lifespan (Capelli et al., 2000; Cardellicchio et al., 2002; Caurant et al., 1994; Lahaye et al., 2006).

Recently, few studied have reported associations among metals in the different tissues (Andreani et al., 2008; García-Fernández et al., 2009; Gardner et al., 2006; Maffucci et al., 2005; Torrent et al., 2004) and blood (Ikonomopoulou et al., 2011; Innis et al., 2008; Jerez et al., 2010; Kenyon et al., 2001; Ley-Quiñonez et al., 2011) in sea turtles. Some of the correlations observed in the present study have been previously described (such as the correlations between Zn and Cu, Cd and Fe, Cd and Mn and Cu and Se). There are still many unknown about the possible functions or effects of trace metals in sea turtles. However, correlations among particularly toxic metals have been deeply studied. The statistically significant correlation

between Se and Hg has been previously detected (Jerez et al., 2010; Maffucci et al., 2005; Storelli et al., 1998b), suggested that this essential element play a protective role against Hg toxicity in sea turtles (Perrault et al., 2011). However, this correlation was not observed in the present study. Cd is one of the most toxic elements and can have various deleterious effects on wildlife (Barbieri, 2009b). This study finds several correlations between Cd and trace metals concentrations. The correlations of Cd and other metals (particularly Zn and Cu) in tissues of sea turtles have been emphasized in previous studies suggested that both metals play a Cd detoxifying role (Andreani et al., 2008; García-Fernández et al., 2009; Gardner et al., 2006; Maffucci et al., 2005). However, we detected inverse correlations of Cd with Cu and Zn in blood of analyzed specimens. Furthermore, we also observed a positive correlation between Cu and Zn. Ikonopoulou et al. (2011) suggested that these trace elements might be involved in similar physiological mechanism.

## Association between trace metals and health parameters

It has been proposed by others that blood levels of inorganic elements could influence some hematological parameters. Thus, the lower RBC counts associated with higher concentrations of Cd could indicate that Cd concentrations causes anemia in loggerhead turtles. Previous studies have also suggested that organochlorine contaminants could cause anemia in sea turtles (Camacho et al., 2013b; Keller et al., 2004c). Furthermore, associations between WBC, and heterophils with organochlorinate contaminants have been previously reported in freshwater turtles (*Trachemys scripta elegans*) (Yu et al., 2012) and in marine turtles (Camacho et al., 2013b; Keller et al., 2004c), suggesting modulation of the immune system. Subtle negative effects of persistent contaminants on sea turtle immune function have been previously suggested in sea turtles even at low concentrations (Day et al., 2007; Keller et al., 2006).

Also, our results shown several associations between biochemical parameters and trace metals as previous studies in organochlorine contaminants (Keller et al., 2006; Swarthout et al., 2010) and trace metals (Innis et al., 2008). Correlations between renal failure indicators and trace metals have been found (**see Table 16**). The alteration in the ion regulation by the influence of organochlorine contaminants in different species has been previously suggested (McConnell, 1985). Moreover, it has been reported that heavy metal can induce renal damage in mammals (Confer and Panciera, 2001). There are still many unknowns about the distributions of the enzymes among the different tissues in reptiles, and particularly marine turtles. This fact make difficult to interpret the correlations observed between plasma enzymes and contaminants. We agree with Swarthout et al. (2010) that future studies of free ranging sea turtles would benefit from the development of more sensitive biomarkers to persistent pollutants.



# Conclusions

1. Among several surveys on metal accumulation in sea turtles from different areas of the world, the present survey is the study with highest number of loggerhead analyzed.
2. We have compared the levels detected in female nesting from Cape Verde with those from others location. In general female turtles from this study presented lower concentrations. Having into account the large number of animals involved in this study we can assure that these figures represent the basal levels of these inorganic elements in healthy nesting loggerhead sea turtles, and, as a consequence, these values may be used as reference in future studies involving such population.
3. Few previous studies have observed correlations between inorganic elements and clinical parameters. Our results indicate that metals pollutants are present in the Cape Verde loggerhead turtles nesting population and could exert negative effects on several health parameters.
4. Additionally, our study reinforce the utility of blood as an excellent sample to monitoring, in a relatively non-invasive way, levels of contamination by toxic inorganic elements in sea turtles.



# CAPÍTULO VI

Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)



**CAPÍTULO VI**

**Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles:  
evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles**

<b><i>(Caretta caretta)</i></b> .....	209
ABSTRACT .....	211
INTRODUCTION .....	212
MATERIAL AND METHODS (Animal data).....	213
RESULTS .....	214
DISCUSSION .....	219
CONCLUSIONS .....	223

## Potential adverse health effects of persistent organic pollutants (POPs) on sea turtles: evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles

### Abstract

The Cape Verde nesting population of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) is the third largest population of this species in the world. For conservation purposes, it is essential to determine how these reptiles respond to different types of anthropogenic contaminants. We evaluated the presence of organochlorine pesticides (OCPs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the plasma of adult nesting loggerheads from Boavista Island, Cape Verde, and studied the effects of the contaminants on the health status of the turtles using hematological and biochemical parameters.

All turtles had detectable levels of non-dioxin like PCBs, whereas dioxin-like congeners (DL-PCBs) were detected in only 30% of the turtles. Packed cell volume and red blood cell counts decreased with higher concentrations of PCBs, which suggests that PCB exposure could result in anemia in sea turtles. In addition, a negative association between some OCPs and PAHs and white blood cells (WBC) and thrombocyte estimate was noted.

The DDT-metabolite, *p,p'*-DDE was negatively correlated with the Na/K ratio and, additionally, a number of correlations between certain PAHs and electrolyte balances were found, which suggest that exposure to these environmental contaminants could affect the kidneys and salt glands in sea turtles.

Additionally, several correlations were observed between these environmental pollutants (OCPs and PAHs) and enzyme activity (ALT, ALP and amylase) and serum protein levels, pointing to the possibility that these contaminants could induce adverse metabolic effects in sea turtles.

Our results indicate that anthropogenic pollutants are present in the Cape Verde loggerhead turtle nesting population and could exert negative effects on several health parameters. Because of the importance of this loggerhead nesting population, protective regulations at national and international levels as well as international action are necessary for assuring the conservation of this population.

## Introduction

The Cape Verde nesting population of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) is the second largest population of this species in the Atlantic and the third in the world after the nesting populations of Oman and Southeast Florida (Marco et al., 2011). López-Jurado et al. (2000a) reported the presence of loggerheads at practically all of Cape Verde's Islands and confirmed nesting activity on Sal, Boavista, Maio and Sao Vicente Islands. Almost 90% of the nesting of Cape Verde loggerheads occurs on the island of Boa Vista, the largest of the eastern islands. The population is currently estimated at greater than 15,000 nests per year (Marco et al., 2012). This population is genetically distinct from other loggerhead populations in the Atlantic and the Mediterranean (Monzón Argüello et al., 2010). Although other sea turtle species have been observed in the area, such as the olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), leatherback (*Dermochelys coriacea*), hawksbill (*Eretmochelys imbricata*), and green turtle (*Chelonia mydas*), the loggerhead sea turtle is the most common species and the only one that nests on the Cape Verde Islands.

There are many anthropogenic causes of sea turtle mortality that have contributed to the decline in local and global numbers of marine turtles. Because of the status of the loggerhead sea turtle, which is listed as endangered on the Red List of the International Maritime Organization (IUCN 2012), a turtle conservation program led by Natura 2000 and the Cape Verde Government has been operating in this region since 1999. This program has included the reinforcement of the local sea turtle law, the monitoring and protection of nesting beaches, sea turtle research, environmental monitoring, and the implementation of environmental education programs (López Jurado et al., 2000b).

The deleterious effect of environmental pollutants is currently included among the top 20 research topics for sea turtle conservation (Hamann et al., 2010). Although environmental pollutants in sea turtles have been assessed by several authors throughout the world (D'Illio et al., 2011; Labrada-Martagón et al., 2011; Perugini et al., 2006; Pugh and Becker, 2001; Ragland et al., 2011; Storelli et al.,

2007; van de Merwe et al., 2010), and our group has recently reported the level of contamination by PAHs in loggerhead sea turtles from the Cape Verde archipelago (Camacho et al., 2012), very few studies have documented the health effects derived from these exposures (Keller et al., 2004c; Swarthout et al., 2010). For sea turtle conservation purposes, it is essential to determine how these reptiles respond to different types of anthropogenic contaminants.

Although the feeding grounds for juvenile loggerhead sea turtles from Cape Verde have not been identified (Monzón Argüello et al., 2010), the Atlantic coast of Africa, between Mauritania and Sierra Leone, is their feeding area during the non-reproductive period for adult female loggerheads and possibly also for males (Cejudo et al., 2008). In addition, a dichotomy has been observed in the migratory behavior of loggerhead turtles from Cape Verde: the larger turtles migrate southward to benthic feeding grounds along the coast of Sierra Leone, whereas small-sized females migrate to oceanic waters off of Mauritania, Gambia and Senegal (Hawkes et al., 2006). Currently, none of these marine areas have special protection (i.e., from the International Maritime Organization) to preserve their recognized biodiversity.

We hypothesized that the anthropogenic alteration of the marine environment could have a relevant impact on the sea turtle population in Cape Verde. To explore this possibility, we developed the present study to measure the potential effect of environmental contaminants on the health status of these marine turtles using a panel of hematological and biochemical parameters.

## Materials and methods

### Animal data

Blood samples were collected from 50 nesting female loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). Animals were sampled during August 2011 on Boavista Island, the Republic of Cape Verde. Nesting females were approached after nest-building behavior ceased and egg-laying activity had finished. A complete visual physical examination was performed, and the curved carapace length (CCL) was measured. A foraging dichotomy among sexually mature females has been observed in which large adult females forage primarily in neritic habitats and smaller adult females forage primarily in oceanic habitats (Eder et al., 2012; Hawkes et al., 2006). According to these previous reports, we compared both groups of turtles: large and small turtles.

# Results

## Morphometric characteristics and clinical parameters of the turtles

The mean and standard deviation of the CCL of the turtles were  $84.23 \pm 5.85$  cm (range 75.33-99.50 cm). According to the dichotomy observed by Hawkes et al. (2006), we established two groups: large turtles ( $95.93 \pm 2.90$  cm) ( $n = 8$ ) and small turtles ( $82 \pm 2.77$  cm) ( $n = 42$ ).

The hematological and biochemical parameters are shown in **Table 18**.

In the study of the potential associations between biochemical and hematological parameters and CCL, we observed that large turtles showed lower levels of creatinine ( $p < 0.05$ ), ALP ( $p < 0.01$ ), phosphorus ( $p < 0.01$ ), sodium ( $p < 0.05$ ), and magnesium ( $p < 0.001$ ) than small turtles. On the contrary, higher levels of lymphocytes ( $p < 0.01$ ) were observed in large- compared to small-sized female turtles.

## Profile of contamination by OCPs, PCBs and PAHs

Most of the plasma samples (98%) showed detectable levels of some OCP. However, HCB, *p,p'*-DDE and dieldrin were the only detectable OCPs in the analyzed samples. HCB and *p,p'*-DDE were the OCPs most frequently detected (86% and 98%, respectively).

Although only seven PCB congeners (PCB 28, PCB 52, PCB 118, PCB 123, PCB 138, PCB 153, and PCB 180) were detected in the samples analyzed throughout this work, all of the samples showed detectable levels of several PCB congeners. In addition, all of the samples showed detectable levels of those PCBs that are considered markers of environmental contamination by PCBs (PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180;  $\Sigma$ M-PCBs). However, dioxin-like congeners ( $\Sigma$ DL-PCBs = PCB 77, PCB 81, PCB 105, PCB 114, PCB 118, PCB 123, PCB 126, PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 169 and PCB 189) were detected in only 30% of the samples from the female sea turtles analyzed. Congener 28 (a low-chlorinated congener) was detected in the greatest percentage of turtles, 100% of the samples, followed by PCB 138 (98%), PCB 153 (92%), PCB 180 (82%), PCB 52 (72%), PCB 118 (26%) and PCB 123 (4%).

In addition, most of the plasma samples (98%) showed detectable levels of some OCP. However, HCB, *p,p'*-DDE and dieldrin were the only detectable OCPs in the analyzed samples. HCB and *p,p'*-DDE were the OCPs most frequently detected (86% and 98%, respectively).



**Table 18.** Hematological and plasma biochemical values for adult nesting loggerhead sea turtles sampled in summer of 2011 from Boavista Island, Cape Verde.

Parameter	Mean $\pm$ SD	Median (Range)
<b>Hematology</b>		
PCV (%)	36.92 $\pm$ 5.33	38.00 (21.00-48.00)
RBC (x 10 <sup>10</sup> cells/L)	40.40 $\pm$ 8.46	40.00 (26.00-60.00)
WBCs (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	4.80 $\pm$ 1.89	4.60 (1.20-1.26)
Thrombocyte estimate (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	16.94 $\pm$ 3,650.38	16.00 (9.02-26.00)
Heterophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	3.65 $\pm$ 8.10	3.64 (2.88-4.37)
Eosinophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.80 $\pm$ 7.80	0.79 (0.09-1.71)
Lymphocytes (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.15 $\pm$ 2.47	0.14 (0.00-0.53)
Monocytes (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.19 $\pm$ 2.15	0.19 (0.00-0.43)
Basophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.007 $\pm$ 0.42	0.00 (0.00-0.09)
<b>Biochemistry</b>		
Total protein (g/dL)	4.61 $\pm$ 0.58	4.60 (3.10-6.20)
Albumin (g/dL)	1.65 $\pm$ 0.23	1.70 (1.10-2.30)
Globulin (g/dL)	2.96 $\pm$ 0.41	2.95 (2.00-4.10)
Alb:Glo ratio	0.56 $\pm$ 0.07	0.56 (0.40-0.72)
Glucose (mg/dL)	87.18 $\pm$ 23.99	87.00 (38.00-136.00)
Creatinine (mg/dL)	0.38 $\pm$ 0.07	0.40 (0.20-0.50)
Uric acid (mg/dL)	0.82 $\pm$ 0.33	0.75 (0.10-19.00)
Urea (mg/dL)	31.3 $\pm$ 8.14	29.00 (14.00-56.00)
Total bilirubin (mg/dL)	0.16 $\pm$ 0.02	0.16 (0.11-0.21)
Total cholesterol (mg/dL)	336.24 $\pm$ 92.54	334.50 (177.00-584.00)
Triglyceride (mg/dL)	977.34 $\pm$ 326.52	971.00 (266.00-1,667.00)
ALT (UI/L)	2.18 $\pm$ 3.18	1.00 (1.00-22.00)
AST (UI/L)	221.40 $\pm$ 67.15	209.50 (87.00-382.00)
ALP (UI/L)	15.88 $\pm$ 7.11	15.00 (9.00-50.00)
LDH (UI/L)	134.68 $\pm$ 130.54	99.00 (1.00-671.00)
GGT (UI/L)	0.89 $\pm$ 0.40	1.00 (0.50-2.00)
CPK (UI/L)	855.28 $\pm$ 1,274.59	483.00 (128.00-8,201.00)
Amylase (UI/L)	557.04 $\pm$ 192.50	547.50 (83.00-1,002.00)
Lipase (UI/L)	22.20 $\pm$ 15.41	19.00 (2.00-80.00)
Sodium (mmol/L)	148.96 $\pm$ 5.75	150.00 (117.00-155.00)
Potassium (mmol/L)	4.10 $\pm$ 0.35	4.15 (3.30-5.10)
Na:K ratio	36.45 $\pm$ 2.60	35.73 (30.00-42.57)
Chloride (mmol/L)	108.03 $\pm$ 4.75	108.00 (85.00-116.00)
Calcium (mg/dL)	13.43 $\pm$ 4.22	13.25 (1.20-20.60)
Phosphorus (mg/dL)	8.24 $\pm$ 1.86	8.10 (5.00-15.02)
Ca:P ratio	1.66 $\pm$ 0.52	1.67 (0.11-3.23)
Magnesium (mg/dL)	6.94 $\pm$ 1.15	6.77 (4.52-11.48)

Some PAHs were detected in all plasma samples. Phenanthrene and fluorene were the chemicals most frequently detected (in 100% and 94% of the plasma samples, respectively).

The concentrations of OCPs, PCBs and PAHs and the percentage of detection of each contaminant are presented in **Table 19**. In our study we found that the highest levels of contamination were from PAHs (median  $\Sigma$ PAHs: 1.22 ng/ml). On the contrary, we observed that the total burden of OCPs was low (median: 0.069 ng/ml) and that the median concentrations of  $\Sigma$ PCBs were approximately 0.11 ng/ml.

**Table 19.** POPs levels (ng/ml) in plasma samples of female nesting loggerhead sea turtles.

Variable	Mean $\pm$ SD	Median (range)	% Detected
<b>Pesticides</b>			
HCB	0.012 $\pm$ 0.01	0.009 (< LOD-0.064)	86
<i>p,p'</i> -DDE	0.075 $\pm$ 0.07	0.057 (< LOD-0.377)	98
Dieldrin	0.008 $\pm$ 0.03	0.000 (< LOD-0.174)	6
$\Sigma$ OCPs	0.095 $\pm$ 0.08	0.069 (< LOD-0.382)	98
<b>PCB congeners</b>			
PCB-28	0.145 $\pm$ 0.09	0.14 (0.04-0.48)	100
PCB-52	0.013 $\pm$ 0.01	0.01 (< LOD-0.06)	72
PCB-118	0.005 $\pm$ 0.01	0.00 (< LOD-0.08)	26
PCB-123	0.0006 $\pm$ 0.02	0.00 (< LOD-0.02)	4
PCB-138	0.08 $\pm$ 0.09	0.05 (< LOD-0.55)	98
PCB-153	0.047 $\pm$ 0.06	0.03 (0.00-0.44)	92
PCB-180	0.023 $\pm$ 0.02	0.02 (< LOD-0.17)	82
$\Sigma$ M-PCBs	0.316 $\pm$ 0.23	0.25 (0.08-1.41)	100
$\Sigma$ DL-PCBs	0.006 $\pm$ 0.01	0.00 (< LOD-0.08)	30
$\Sigma$ PCBs	0.31 $\pm$ 0.23	0.25 (0.08-1.41)	100
<b>PAHs</b>			
Naphtalene	0.07 $\pm$ 0.38	0.00 (< LOD-2.69)	14
Acenaphtene	0.016 $\pm$ 0.04	0.00 (< LOD-0.25)	14
Fluorene	0.24 $\pm$ 0.16	0.20 (< LOD-0.82)	94
Anthracene	0.003 $\pm$ 0.01	0.00 (< LOD-0.12)	4
Phenanthrene	1.21 $\pm$ 0.74	0.92 (0.50-3.48)	100
Fluoranthrene	0.03 $\pm$ 0.04	0.03 (< LOD-0.16)	68
Pyrene	0.04 $\pm$ 0.04	0.02 (< LOD-0.16)	68
Benzo [a] anthracene	0.005 $\pm$ 0.03	0.00 (< LOD-0.24)	6
Chrysene	0.006 $\pm$ 0.03	0.00 (< LOD-0.24)	4
$\Sigma$ PAHs	1.64 $\pm$ 1.14	1.22 (0.67-7.11)	100

LOD = Limit of detection.

## Association between contaminants and clinical parameters and morphometric data

A number of weak but significant correlations between POP levels and clinical parameters were found (**Tables 20 and 21**).

Thus, the hematological parameters were correlated with several POPs. We noted an inverse association between the most prevalent PCBs in marine turtles (congeners 138 and 180) and PCV. Additionally, PCB 52 was negatively associated with WBCs; similarly, a negative association between HCB and both WBC and the thrombocyte estimate was also noted. In addition, *p,p'*-DDE was negatively correlated with heterophils, although it was positively correlated with eosinophils. Furthermore, several hematological associations between the hematological parameters and PAHs were observed.

Additionally, several correlations were detected between the biochemical parameters and contaminants analyzed. For example, the turtles showing the highest levels of PCB 52 presented the lowest concentrations of glucose. On the contrary, a positive correlation was found between PCB 52 and phosphorus. Furthermore, lower levels of uric acid and total cholesterol were associated with higher concentrations of  $\Sigma$ M-PCBs. Additionally, a negative correlation was found between GGT and *p,p'*-DDE and  $\Sigma$ OCPs.

Moreover, several correlations were observed between PAHs and enzyme activity (ALT, ALP and amylase). In addition, total protein, albumin and globulins were positively correlated with levels of contamination by several PAHs (i.e., phenanthrene and fluoranthene).

Furthermore, we noted several correlations between electrolyte levels and POP levels. Potassium, calcium, phosphorus and magnesium were positively correlated with phenanthrene, fluoranthene, and  $\Sigma$ PAHs. However, a negative correlation was observed between magnesium and  $\Sigma$ PAHs. In addition, a negative correlation between  $\Sigma$ PAHs and total bilirubin was noted.

Regarding to the potential associations between contaminants and size, a positive correlation was observed between CCL and  $\Sigma$ PAHs ( $r = 0.478$ ;  $p < 0.001$ ). In fact, large turtles showed higher median concentrations than small turtles (2.99 vs. 1.08;  $p < 0.001$ ). However, we did not observe any significant correlation between pesticides or PCB congener concentrations and size.

**Table 20.** Positive or negative Spearman correlation coefficient of select pesticides and PCBs with hematological and plasma biochemical health parameters of adult nesting loggerhead sea turtles from Cape Verde (n = 50). Number in cells indicates the positive or negative correlation and the p-value (< 0.05).

<i>Health parameters</i>	<i>Pesticide</i>		
	<i>p,p'-DDE</i>	<i>HCB</i>	<i>ΣOCs</i>
PCV			
RBC			
WBC		-0.32 (0.02)	
Heterophils	-0.34 (0.01)		
Eosinophils	+0.35 (0.01)		
Trombocytes		-0.31 (0.02)	
Glucose			
Uric acid			
Total cholesterol			
GGT	-0.32 (0.02)		-0.42 (0.002)
Phosphorus			
Na/K ratio	-0.31 (0.02)		

**Table 21.** Positive or negative Spearman correlation coefficient of select PAH with hematological and plasma biochemical health parameters of adult nesting loggerhead sea turtles from Cape Verde (n = 50). Number in cells indicates the positive or negative correlation and the p-value (< 0.05)

<i>Health parameters</i>	<i>Fluorene</i>	<i>Phenantrene</i>	<i>Fluoranthene</i>	<i>ΣPAHs</i>
WBC				
Eosinophils				-0.308 (0.03)
Monocytes				+0.33 (0.019)
Trombocytes				-0.29 (0.03)
Total protein			+0.33 (0.019)	
Albumin		+0.33 (0.01)	+0.31 (0.02)	
Globulin			+0.30 (0.03)	
Total bilirubin				-0.3 (0.03)
ALT		+0.28 (0.04)		
ALP				-0.33 (0.01)
Amylase	-0.46 (0.001)			
Creatinine				
Potassium		+0.337 (0.01)		
Calcium			+0.447(0.001)	
Phosphorus			+0.326 (0.02)	
Magnesium			+0.304 (0.03)	-0.42 (0.002)

		PCBs			
28	52	138	180	$\Sigma M$ -PCBs	$\Sigma PCBs$
		-0.31 (0.03)	-0.32 (0.02)		
-0.34 (0.01)					
	-0.32 (0.02)				
	-0.33 (0.01)				
				-0.32 (0.02)	-0.32 (0.02)
		-0.28 (0.04)		-0.28 (0.04)	
	+0.29 (0.03)				

## Discussion

In this study, the baseline data of hematological and plasma chemistry values for female nesting loggerheads from Cape Verde, profiles of the presence of POPs in plasma, and potential associations between levels of contaminants and clinical parameters are presented.

Establishing biochemical and hematologic reference values for sea turtles is important for evaluating the health status of turtles, and therefore, baseline blood values can be used for conservation purposes as an indicator of population health. Many research groups have reported reference intervals for marine turtles (Bolten and Bjorndal, 1992; Casal and Orós, 2009; Deem et al., 2009; Flint et al., 2010; Jacobson et al., 2007; Stamper et al., 2005; Swimmer, 2000). The majority of the hematological and plasma chemistry values from our study were within the range of values reported in other studies for loggerhead turtles (Deem et al., 2009; Stamper et al., 2005; Turnbull et al., 2000). Only one previous publication studied hematological and biochemical parameters in female loggerhead sea turtles from the Cape Verde nesting area (Casal et al., 2009). The median values obtained in the present study were very similar to most of the parameters analyzed in that previous study. However, we observed higher values of RBC, WBC, monocytes, AST, glucose and triglycerides and smaller values of lymphocytes, thrombocytes, total bilirubin and ALP. Variability in biochemistry and hematology values for healthy turtles may occur due to nutritional status, age, sex, nesting stage, migratory status, diet, geographical locations, habitats, pathogens, toxin exposure, genetics and environmental conditions (Deem et al., 2009; Lutz and Dunbar-Cooper, 1987;

Stamper et al., 2005). These factors could also explain the differences observed in several hematological and biochemical parameters among both size groups that were analyzed.

Several studies have examined loggerhead turtles for PCBs and OCPs (Corsolini et al., 2000; Keller et al., 2004a; Lazar et al., 2011; Monagas et al., 2008; Orós et al., 2009; Perugini et al., 2006; Storelli et al., 2007). However, studies on PAHs in sea turtles are quite scarce (Alam and Brim, 2000; Camacho et al., 2012; Godley et al., 1998a; Hall et al., 1983). Although the use of PCBs and OCPs has been banned or reduced in most developed countries since the 1980s, these chemical compounds are well known for the lipophilic character, resistance to degradation, and are still present in the environment and therefore in wildlife throughout the world (Peterle, 1991).

PCB profiles reported by other authors in sea turtles were dominated by the higher chlorinated congeners (PCB 138 > PCB 153 > PCB 180) (Corsolini et al., 2000; Keller et al., 2004a; Lazar et al., 2011; Orós et al., 2009; Perugini et al., 2006; Storelli et al., 2007). However, in our study, the congener most frequently detected in plasma samples from adult nesting loggerheads was PCB 28. This result was also observed by Gardner et al. (2003) in green turtles. Different degrees of contamination in sea turtle tissues from different locations around the world have been observed (Corsolini et al., 2000; Gardner et al., 2003; Lake et al., 1994; McKenzie et al., 1999; McKim and Johnson, 1983). In this context, it should be noted that DL-PCBs have been recognized as having a negative effect on animals but that M-PCBs (the most prevalent in the environment) may also exert deleterious effects on animal health (Fox, 2001a).

According to the bibliography and the present study, *p,p'*-DDE is, in general, the pesticide present in the greatest concentrations in sea turtles due to its highly persistent nature (Keller et al., 2004a; Lake et al., 1994; Lazar et al., 2011; McKenzie et al., 1999; Monagas et al., 2008; Perugini et al., 2006; Rybitski et al., 1995; Storelli et al., 2007; Storelli and Marcotrigiano, 2000). DDE has a particular significance because of its undesirable effects on environmental quality and animal health (Guillette, 2000).

All plasma samples from our turtles had detectable values of at least one type of PAH. Studies investigating PAHs have primarily focused on aquatic ecosystems (Kannan and Perrotta, 2008; Marsili et al., 2001). Several studies evaluated the effects of oil on sea turtles through the direct application of crude oil, demonstrating that sea turtles are vulnerable to the effects of crude oil at all life stages (Lutcavage et al., 1997a; Lutz et al., 1986). Although, no study has proven that oil exposure leads to elevated PAH concentrations in the blood, in a previous study the mean concentrations of fluoranthene was much higher in juvenile loggerhead turtles stranded due to crude oil ingestion (Camacho et al., 2012). Nevertheless, we have to take into account that PAHs come from burning fossil fuels, and urban runoff, not only from oil spills.

The study published by Camacho et al. (2012) was the first to report blood levels of PAHs in sea turtles. The differences observed between  $\Sigma$ PAH concentrations in that study as compared to the present one (5.95 vs. 1.64 ng/ml) are difficult to explain. This unexpected result might be due to the fact that PAHs could be rapidly metabolized and may disappear from the blood. Thus, the possibility exists that differences among animals in polymorphisms in genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes (i.e., glutathion-S-sulfotransferase, cytochrome P450, N-acetyl-Transferase) highly impact on blood levels of contaminants (Richardson et al., 2009). Thus, inter-individual differences in the detoxifying capacity of turtles may explain huge differences in pollutants levels among individuals (Richardson et al., 2010).

Attending to the insignificant degree of biomagnification of PAHs previously targeted in aquatic organism (Nakata et al., 2003; Perugini et al., 2007), the higher levels of  $\Sigma$ PAHs found in larger vs. smaller turtle were unexpected. Many higher trophic-level aquatic organisms can metabolize PAHs (Roscales et al., 2011). Therefore, PAH concentrations in sea turtles could be directly related to recent exposure to waters or food contaminated by PAHs. A difference in feeding areas has been observed between large- and small-sized female turtles from Cape Verde (benthic and oceanic, respectively) (Hawkes et al., 2006). This difference in feeding could explain the statistically significant differences in PAH levels. Since oil production started off the coasts of Mauritania, Senegal, Gambia, Guinea-Bissau, Guinea, and Sierra Leone, oil spills from offshore fields, intensive traffic of oil tankers and uncontrolled spillage of oil residues from the tankers may have contributed to the presence of PAHs in the plasma of loggerhead turtles from Cape Verde.

Few previous studies have reported correlations between levels of organic (Keller et al., 2004c; Swarthout et al., 2010) or inorganic contaminants (Day et al., 2007; Innis et al., 2008) and clinical health parameters in sea turtles. In the present study, we detected several associations between the contaminant concentrations and the clinical parameters. Thus, several correlations were observed between the different PCB congeners and the overall health indicators, such as cell counts and biochemical parameters. PCV and RBC decreased with higher concentrations of several PCB congeners. The association between RBC and DL-PCBs has been previously described in loggerhead sea turtles (Keller et al., 2004c), suggesting that PCBs could result in anemia in sea turtles.

Regarding the influence of contaminants on the blood cell counts it is also remarkable that in a recent study total WBC and heterophil counts were also negatively associated with PCB levels in red eared slider turtles (Yu et al., 2012), pointing to the possibility that PCB may suppress immune function in turtles. In fact an inverse correlation between WBC counts and concentrations of pesticides was reported previously in juvenile loggerhead turtles (Keller et al., 2004c). Similarly to Keller's results, in our study higher concentrations of *p,p'*-DDE were

associated with lower heterophil values, and also were associated with higher eosinophil values. Keller et al. (2004c) observed the same positive association between eosinophil values and  $\Sigma$ DDTs and  $\Sigma$ OCPs.

Although experiments on the physiological and clinicopathological effects of crude oil have been studied in loggerhead sea turtles (Lutcavage et al., 1997b), the present survey is the first study reporting correlations between internal contamination with PAHs and health indicators in sea turtles. Temporal hematologic changes associated with direct exposure to oil have been previously observed (Lutcavage et al., 1997b). In a recent study by Casal and Orós (2009) observed that juvenile loggerhead turtles stranded by crude oil ingestion had significantly lower RBC, and significantly higher WBC and thrombocyte counts, than those observed in clinically normal turtles.

Correlations between PCBs and biochemical parameters were also found. Decreases in glucose levels associated with high levels of PCBs have been reported previously in other vertebrate species (Boll et al., 1998). Additionally, a negative correlation between glucose and the adipose concentration of dieldrin and  $\Sigma$ DDTs in the loggerhead sea turtle has been reported and suggests that organochlorine contaminants may be affecting glucose regulation (Keller et al., 2004c). In addition, higher phosphorus concentrations were associated with higher levels of PCB 52. A Ca:P ratio of  $< 1$  has been considered indicative of kidney disease in reptiles (Campbell, 2004). However, in the present study, we did not observe any correlations of the contaminant levels with the Ca:P ratio.

In addition, we observed a negative correlation between blood concentrations of *p,p'*-DDE and  $\Sigma$ OC pesticides and GGT. Although tissue levels of GGT are low in chelonians, high levels of GGT could indicate liver damage (Divers, 2000). Keller et al. (2004c) also observed a negative association between GGT and the pesticide dieldrin. Nevertheless, due to the lack of previous studies determining the distribution of enzymes among organs of sea turtles, it is difficult to interpret the correlations observed.

In sea turtles the electrolyte balance is regulated by the kidneys and salt glands. Our results indicated a negative association between *p,p'*-DDE and the Na/K ratio and agree with the results found by McConnell (1985) reporting that kidneys and salt glands are sensitive to POPs. Thus, the alteration in ion regulation found in our study could be due to the influence of OCPs on these organs.

We found a weak but significant influence of PAH levels on blood enzymes. Sea turtles stranded by crude ingestion showed had significantly higher values of ALT and ALP (Casal and Orós, 2009). However, the scarce number of studies in reptiles evaluating levels of PAHs, blood enzymes, and their potential relationship makes it difficult to compare these results with other studies or to understand the potential effects.



In addition, we noted several significant correlations between electrolyte levels and PAHs (such as a negative association between magnesium and  $\Sigma$ PAHs). Furthermore, total proteins, albumin, globulins and creatinine were positively correlated with several PAHs. These findings suggest that PAHs could affect kidney in sea turtles.

From our results it seems clear that environmental pollutants may influence adversely different hematological or biochemical parameters, but in any case the contaminants are the only factors that are modulating these parameters. In this sense, it seems obvious that other confounding or unknown factors (not recorded in our work) could be influencing such clinical parameters. Therefore, further studies are necessary to explore the potential role exerted by POPs on clinical parameters in these reptiles. In any case, studies must take into account the enormous variability in clinical parameters found in sea turtles. Other studies using different sensitive biomarkers of exposure to POPs could help to understand the deleterious effects of these chemicals on the health status of turtles.

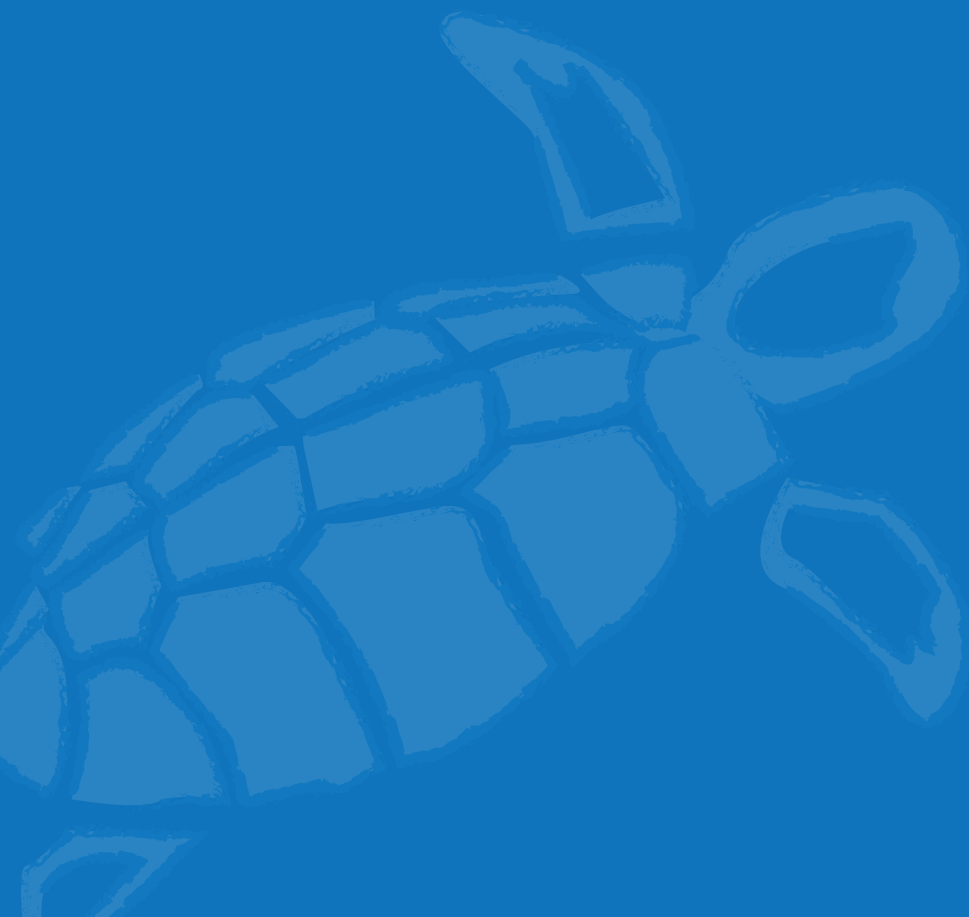
## Conclusions

1. This study represents the first evaluation of the potential effects of persistent organic pollutant in loggerhead sea turtles from Cape Verde.
2. Several associations between POP levels and clinical parameters were found. Few previous studies have observed a correlation between organochlorine contaminants and heavy metals with clinical parameters. However, this study is the first reference that evaluates association between PAHs and clinical parameters.
3. Our results support the idea that anthropogenic pollutants are present in the Cape Verde loggerhead turtle nesting population. Because of the importance of this loggerhead nesting population, protective regulations at national and international levels and international action by the IMO (International Maritime Organization) are necessary to assure the conservation of this population.
4. We recommend that additional studies on the presence of contaminants in other life stages (i.e., eggs, hatchlings, and juveniles) be used to provide more comprehensive information on the impact of contaminants on the survival of this population.



# CAPÍTULO VII

Monitoring organic pollutants  
and metals in juvenile  
loggerhead sea turtles  
(*Caretta caretta*) undergoing  
rehabilitation



**CAPÍTULO VII**

**Monitoring organic pollutants and metals in juvenile loggerhead sea turtles**

**(*Caretta caretta*) undergoing rehabilitation .....**225

ABSTRACT .....227

INTRODUCTION .....228

MATERIAL AND METHODS (Animal data).....229

RESULTS .....229

DISCUSSION .....232

CONCLUSIONS .....239

## **Monitoring organic pollutants and metals in juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) undergoing rehabilitation**

### **Abstract**

The occurrence of chemical elements and organic contaminants in loggerhead turtles undergoing rehabilitation has been studied in samples from 61 juvenile turtles, trying to establish differences between the concentrations of pollutants along the period of rehabilitation of these turtles (initial vs. convalescent). Plasma chemistries, hematology and corporal condition were also assessed and correlated with contaminants concentrations. In addition, we studied differences between turtle's evolution and the different stranding causes with contaminants concentrations. We observed initial higher concentrations of marker polychlorinated biphenyls (M-PCBs = 27.49 ng/ml) and  $\Sigma$ PCBs (27.58 ng/ml) versus convalescent concentrations (9.42 and 9.51 ng/ml, respectively). However, no significant differences were observed between initial and convalescent organochlorine pesticide (OCP) and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) plasma concentrations. Initial blood concentrations of Zn, Ni, As and Se were higher than convalescent blood concentrations. In addition, cachectic animals showed significant higher concentrations of OCPs and PCBs. Our results suggested that the mobilization of lipid stores can cause variations in the plasma concentrations of some contaminants. Also, several associations between POP and metal levels and clinical parameters were found, indicating that anthropogenic pollutants could exert effects on several health parameters.

# Introduction

Evaluating effects of anthropogenic factors is now a top global research priority for marine turtle conservation, being the specific impacts of pollution on marine turtles identified as an area needing study (Hamann et al., 2010).

Organochlorine pesticide (OCPs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and inorganic contaminants have been previously studied in different tissues of sea turtles (Andreani et al., 2008; Gardner et al., 2006; Jerez et al., 2010; Lazar et al., 2011; Perugini et al., 2006; Storelli et al., 2007), blood (Anan et al., 2001; Kenyon et al., 2001; Labrada-Martagón et al., 2011; Ragland et al., 2011; van de Merwe et al., 2010) or eggs (Alava et al., 2006; Alava et al., 2011; Páez-Osuna et al., 2010b). However, studies on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sea turtles are very scarce (Alam and Brim, 2000; Camacho et al., 2012; Godley et al., 1998a; Hall et al., 1983). Many of the contaminants, particularly lipophilic chemicals, are readily accumulated by resident organisms through a variety of mechanisms such as direct contact (water, sediment) or dietary uptake. Indeed, contaminant accumulation has been reported in a diverse array of taxa, including reptiles (Gardner, 2006b).

It is well known that these contaminants can cause carcinogenic, neurodevelopmental, reproductive and endocrine effects in a variety of species (Fox, 2001a; Stoica et al., 2000; Vos et al., 2000). However, relatively very few studies have documented the health effects derived from these exposures in sea turtles (Day et al., 2007; Keller et al., 2004c; Keller et al., 2006; Orós et al., 2012b; Swarthout et al., 2010).

Among the seven species of sea turtles currently recognized, the most common species in the Canary Islands is the loggerhead (*Caretta caretta*) (Monzón-Argüello et al., 2009). Diseases and causes of mortality among turtles stranded in the Canary Islands have been previously reported (Orós et al., 2012a; Orós et al., 2004; Orós et al., 2005). Data available for baseline levels of contaminants in sea turtle populations of the Canary Islands have been published (Monagas et al., 2008; Orós et al., 2009; Torrent et al., 2004).

In the present study we evaluate the associations between plasma concentrations of organic pollutants and metals and physical characteristics and clinical parameters of stranded loggerheads. In addition, we monitored plasma concentrations of contaminants during the rehabilitation period (initial and convalescent data) of these stranded loggerheads.

# Materials and methods

## Animal data

A total of 61 loggerhead sea turtles stranded in Canary Islands and admitted to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center (TWRC, Gran Canaria Island, Canary Islands, Spain) were sampled during 2011. Blood samples were collected from the cervical sinus upon admission at the hospital and when the turtles were fully recovery, previously to release. The mean of days of hospitalization was 67 days. All turtles were identified as juvenile or subadult (Bjorndal et al., 2001; Seminoff et al., 2004). Body condition index was calculated using the formula described by Bjorndal et al. (2000a). The causes of stranding were entanglement in fishing nets (n = 49), ingestion of hooks and monofilament lines (n = 4), traumatic carapace injuries (n = 2), malnutrition (n = 4) and unidentified causes (n = 2).

Hematological and biochemistry examinations were performed on 30 of the 61 turtles sampled.

## Results

### Contaminant profile during the rehabilitation period

All the analyzed samples showed detectable levels of some type of PAH and some PCB congener. OCPs were detected in 87.3 and 96.8% (initial vs. convalescent) of the samples. Among the OCPs, *p,p'*-DDE (85.7 vs. 95.2%) and HCB (44.4 vs. 63.5%) were the chemicals most frequently detected. The PCB congeners most frequently detected were PCB-138, PCB-153 and PCB-180 (each one detected in more than 90% of the plasma samples). Among PAHs, phenantrene was the most frequently detected (96.8% in both, initial and convalescent values). Among metals, Hg, Pb, Cd and As were detected in all the samples.

The plasma concentrations of contaminants during the rehabilitation period for those turtles that survived (n = 56) are presented in **Table 22**. Several significant differences were observed between initial and convalescent PCB plasma concentrations. Initial plasma samples presented higher levels of PCB-138, PCB-153, PCB-180 and PCB-118 than convalescent plasma samples. In addition, higher concentrations of initial M-PCBs (27.49 ng/ml) and  $\Sigma$ PCBs (27.58 ng/ml) were observed versus convalescent concentrations (9.42 and 9.51 ng/ml, respectively). However, no significant differences were observed between initial and convalescent pesticide and PAH plasma concentrations. Initial plasma concentrations of Zn, Ni, As and Se were higher than convalescent plasma concentrations. Mean concentrations of metals followed this pattern: Zn > Se > Al > As > Ni > Cu > Cr > Cd > Hg > Pb > Mn.

**Table 22.** Plasma concentrations of contaminants (ng/ml) from juvenile oggerhead sea turtles during the rehabilitation period.

Variable	Initial concentrations		Convalescent concentrations		P value
	Mean $\pm$ SD	Median (range)	Mean $\pm$ SD	Median (range)	
<b>Pesticides (n = 56)</b>					
HCB	0.42 $\pm$ 0.83	0.00 (< LOD-4.35)	0.37 $\pm$ 0.79	0.05 (< LOD-4.50)	n.s
P, p'-DDE	0.68 $\pm$ 1.01	0.25 (< LOD-4.35)	0.68 $\pm$ 1.01	0.25 (< LOD-4.35)	n.s
Mirex	0.06 $\pm$ 0.38	0.00 (< LOD-2.65)	0.008 $\pm$ 0.06	0.00 (< LOD-0.45)	n.s
$\Sigma$ OCPs	1.16 $\pm$ 1.79	0.25 (< LOD-8.20)	1.14 $\pm$ 1.60	0.35 (< LOD-7.75)	n.s
<b>PCB congeners (n = 56)</b>					
PCB-28	0.52 $\pm$ 0.60	0.40 (< LOD -2.85)	0.35 $\pm$ 0.37	0.30 (< LOD -1.45)	n.s
PCB-52	0.07 $\pm$ 0.11	0.00 (< LOD-0.40)	0.05 $\pm$ 0.08	0.00 (< LOD-0.40)	n.s
PCB-101	0.03 $\pm$ 0.14	0.00 (< LOD-0.95)	0.005 $\pm$ 0.02	0.00 (< LOD-0.15)	n.s
PCB-118	0.81 $\pm$ 2.27	0.15 (< LOD-14.45)	0.22 $\pm$ 0.56	0.05 (< LOD-3.70)	< 0.05
PCB-126	0.0009 $\pm$ 0.07	0.00 (< LOD-0.05)	0.004 $\pm$ 0.002	0.00 (< LOD-0.15)	n.s
PCB-138	14.80 $\pm$ 23.53	4.90 (< LOD-125)	5.04 $\pm$ 8.11	2.55 (< LOD-34.65)	< 0.001
PCB-153	5.99 $\pm$ 11.32	1.60 (< LOD-65.60)	2.00 $\pm$ 2.63	1.20 (< LOD-13.40)	< 0.01
PCB-156	0.03 $\pm$ 0.20	0.00 (< LOD-1.25)	0.01 $\pm$ 0.04	0.00 (< LOD-0.20)	n.s
PCB-157	0.06 $\pm$ 0.25	0.00 (< LOD-1.50)	0.06 $\pm$ 0.16	0.00 (< LOD-1.05)	n.s
PCB-180	5.25 $\pm$ 8.86	1.40 (< LOD-38.75)	1.73 $\pm$ 3.03	0.80 (< LOD-15.30)	< 0.05
$\Sigma$ M-PCBs	27.49 $\pm$ 41.85	9.60 (0.45-192.85)	9.42 $\pm$ 12.72	4.90 (0.55 -63.90)	< 0.05
$\Sigma$ DL-PCBs	0.91 $\pm$ 2.54	0.15 (< LOD-16.30)	0.33 $\pm$ 0.59	0.15 (< LOD-3.75)	n.s
$\Sigma$ PCBs	27.58 $\pm$ 42.09	9.65 (0.45-194.70)	9.51 $\pm$ 12.78	5.10 (0.55-63.90)	< 0.01
<b>PAHs (n = 56)</b>					
Naphtalene	1.30 $\pm$ 2.59	0.00 (< LOD-11.95)	1.07 $\pm$ 2.18	0.00 (< LOD-7.65)	n.s
Acenaphtylene	0.06 $\pm$ 0.47	0.0 (< LOD-3.45)	< LOD	< LOD	-
Acenaphtene	0.006 $\pm$ 0.03	0.00 (< LOD-0.20)	< LOD	< LOD	-
Fluorene	0.19 $\pm$ 0.50	0.00 (< LOD-2.55)	0.20 $\pm$ 0.50	0.00 (< LOD-3.20)	n.s
Anthracene	0.08 $\pm$ 0.47	0.00 (< LOD-3.40)	0.02 $\pm$ 0.14	0.00 (< LOD-1.00)	n.s
Phenanthrene	4.09 $\pm$ 6.48	1.30 (< LOD-35.60)	3.67 $\pm$ 3.78	2.80 (< LOD-15.45)	n.s
Fluoranthrene	0.04 $\pm$ 0.00	0.13 (< LOD-0.60)	0.03 $\pm$ 0.10	0.00 (< LOD-0.50)	n.s
Pyrene	0.21 $\pm$ 0.48	0.05 (< LOD-2.75)	0.14 $\pm$ 0.28	0.05 (< LOD-1.80)	n.s
$\Sigma$ PAHs	6.00 $\pm$ 8.26	2.05 (0.10-38.35)	5.12 $\pm$ 5.27	4.20 (< LOD-18.00)	n.s
<b>Heavy metals and metalloids (n = 22)</b>					
Cu	0.17 $\pm$ 0.07	0.15 (0.05-0.31)	0.15 $\pm$ 0.06	0.15 (0.006-0.25)	n.s.
Mn	0.002 $\pm$ 0.004	0.002 (< LOD- 0.02)	0.002 $\pm$ 0.003	0.001 (< LOD- 0.01)	n.s.
Pb	0.03 $\pm$ 0.03	0.01 (0.002-0.1)	0.02 $\pm$ 0.02	0.02 (0.002-0.06)	n.s.
Zn	4.09 $\pm$ 1.56	3.69 (1.45-9.17)	3.9 $\pm$ 1.48	3.9 (0.001-6.4)	< 0.05
Cd	0.04 $\pm$ 0.02	0.04 (0.008- 0.08)	0.04 $\pm$ 0.03	0.04 (0.004-0.11)	n.s
Ni	1.13 $\pm$ 1.88	0.58 (0.4- 9.3)	0.64 $\pm$ 0.39	0.57 (0.005-2.12)	< 0.05
Cr	0.25 $\pm$ 0.47	0.12 (0.06-2.31)	0.14 $\pm$ 0.09	0.12 (0.001-0.49)	n.s
As	1.08 $\pm$ 1.64	0.39 (0.11-6.13)	0.75 $\pm$ 1.15	0.22 (0.12-4.8)	< 0.01
Al	1.29 $\pm$ 1.16	1 (0.3-5.85)	0.98 $\pm$ 0.61	0.86 (0.002-3.04)	n.s
Se	2.92 $\pm$ 1.38	2.8 (0.58-5.97)	3.71 $\pm$ 1.65	3.35 (0.57-7)	< 0.001
Hg	0.02 $\pm$ 0.02	0.02 (0.008-0.09)	0.03 $\pm$ 0.03	0.02 (0.001-0.12)	n.s



## Variation of contaminant concentrations according to different factors

Five out of 61 turtles died during the hospitalization. Although no significant differences were observed between plasma concentrations of contaminants from turtles that died versus those that survived, turtles that died showed higher median concentrations of  $\Sigma$ PCBs than survived turtles (143 vs. 27.58 ng/ml, respectively). They also showed higher median concentrations of OCPs at the moment of admission at the hospital than turtles that survived (4.5 vs. 1.16 ng/ml, respectively). However, they showed lower initial PAH concentrations than turtles that survived (4.6 vs. 6 ng/ml, respectively).

Furthermore,  $n = 9$  turtles presented severe signs of emaciation. These animals showed higher median  $\Sigma$ OCPs (0.25 ng/ml) and  $\Sigma$ PCBs concentrations (80.15 ng/ml) than the rest of stranded turtles (0.05,  $p < 0.05$  and 4.85 ng/ml,  $p < 0.01$ , respectively). Emaciated turtles ( $n = 6$ ) showed lower levels of Hg than the rest of the turtles ( $n = 22$ ) (0.01 vs. 0.02  $\mu\text{g/g}$ ;  $p < 0.05$ ). However, no significant differences were observed in the PAH concentrations of emaciated and no emaciated turtles.

Regarding the differences among the stranding causes and contaminants concentrations, we only observed significant differences in  $\Sigma$ OCPs concentrations in turtles stranded by malnutrition ( $p < 0.05$ ).

Body condition index (BCI) was negatively correlated with PCB 153 ( $r = -0.42$ ;  $p < 0.05$ ) and PCB 156 ( $r = -0.39$ ;  $p < 0.05$ ) in juvenile turtles upon admission. No other correlation between corporal condition and contaminant concentration was observed.

## Health assessment through clinic parameters and their correlations with contaminants concentrations

Initial and convalescent health assessment data, including physical characteristics, hematological and biochemistry parameters are shown in **Table 23**. Results of statistically significant correlations of organic and inorganic contaminants with hematological and biochemical health parameters (convalescent values) are presented in **Tables 24 and 25**, respectively.

PCV and RBC values were negatively correlated with plasma concentrations of HBC, *p,p'*-DDE and  $\Sigma$ OCPs. No correlations were observed between hematologic parameters and PCBs. Higher concentrations of PAH chemicals (phenantrene) and metals (Mn) showed also lower levels of PCV and RBC. In addition, a negatively correlation between heterophils and  $\Sigma$ PAHs and a positively association between trombocyte and Cu and Pb were detected. Curiously, a positive correlation between WBC and several metals (Cu, Mn, Ni, Cr, As and Hg) was observed.

Furthermore, biochemical changes were observed associated to contaminant concentrations increasing and decreasing. Several negative associations were observed between PCB congeners (28, 118, 153 and 180) and blood enzymes (ALT, amylase and LDH). Also, a negatively association between CPK and pyrene were found. Furthermore, several negatively correlations were found between enzyme activity and metal (Cu, Mn, Pb, Cd, Cr, As, Al and Hg). However, higher levels of amylase, ALP and GGT were detected with higher concentrations of some PAHs. Also, GGT was positively associated with PCB 153 congener. Only one positively associations was detected between LDH and Se.

Also, we noted some significant correlations between electrolyte levels and contaminant concentrations. Higher concentrations of phosphorus were detected with higher levels of  $\Sigma$ PAHs and Mn. On the contrary, we found a negatively correlations between  $\Sigma$ PCBs and magnesium. In addition, several negatively correlations were detected between electrolyte levels and metals concentrations. Furthermore, indicators of kidney healthy were also associated with increased and decreased of inorganic contaminant concentrations.

## Discussion

### Contaminant profile in stranded sea turtles

Several studies were carried out on levels of organic pollutants and chemical elements in sea turtles from different areas of the world (review by Pugh and Becker, 2001) and particularly in loggerheads (review by D'Ilio et al., 2011 and Orós et al., 2012). The different levels of contamination among sea turtles populations would therefore reflect the contamination of their foraging grounds, which would be dependent on regional and local sources of these chemicals (van de Merwe et al., 2010).

OCPs and PCBs in loggerheads have been previously investigated by several researchers (Alava et al., 2006; Alava et al., 2011; Lazar et al., 2011; Monagas et al., 2008; Orós et al., 2009; Perugini et al., 2006; Richardson et al., 2010; Storelli et al., 2007; Storelli and Marcotrigiano, 2000). As in this study, *p,p'*-DDE has been the pesticide generally observed at the greatest concentrations in different species of sea turtles (Lake et al., 1994; Lazar et al., 2011; Mckenzie et al., 1999; Perugini et al., 2006; Rybitski et al., 1995; Storelli et al., 2007; Storelli and Marcotrigiano, 2000). Regarding the PCB congeners, the profile observed in this study was clearly dominated by the higher chlorinated congeners. These results agree with previous studies in marine turtles species (Corsolini et al., 2000; Lazar et al., 2011; Orós et al., 2009; Perugini et al., 2006; Richardson et al., 2010; Storelli et al., 2007). The studies on PAHs in sea turtles are scarce (Alam and Brim, 2000; Camacho et al., 2012; Hall et al., 1983).

**Table 23.** Initial and convalescent physical characteristics and health parameters in juvenile loggerhead sea turtles (n = 30) undergoing rehabilitation.

	Initial value		Convalescent value		P value
	Median	Range	Median	Range	
<b>Morphometrics</b>					
SCL (cm)	33	24-51	-	-	-
SCW (cm)	29	20-47	-	-	-
Weight (kg)	5.85	2.20-20.60	6.05	2.65-22.75	< 0.001
Body condition	16.37	12.54-19.12	18.11*	15.29-31.58*	-
<b>Hematology</b>					
PCV (%)	24	10-45	27.50	17-42	< 0.001
RBC (x 10 <sup>10</sup> cells/L)	25	10-45	28	15-47	< 0.05
WBCs (x 10 <sup>9</sup> cells/L) <sup>†</sup>	9.3	2.7-20.8	6.8	2.1-20.9	< 0.01
Thrombocyte estimate (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	28	12.5-58	31.25	15-60	n.s
Heterophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L) <sup>‡</sup>	8.6	6.92-9.16	7.15	4.49-8.41	n.s
Eosinophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L) <sup>†</sup>	0.05	0-0.2	0.187	0-1.03	< 0.001
Lymphocytes (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.37	0-1.59	1.03	0.19-2.15	< 0.001
Monocytes (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	0.28	0.09-0.75	0.79	0.2-1.77	< 0.001
Basophils (x 10 <sup>9</sup> cells/L)	ND	ND	ND	ND	-
<b>Biochemistry</b>					
Total protein (g/dL)	3.20	2-5	4.20	3-5	< 0.001
Albumin (g/dL)	1	1-2	1.30	1-2	< 0.001
Globulin (g/dL) <sup>†</sup>	2.20	1-4	2.80	2-4	< 0.001
Alb: glo ratio	0.45	0-1	0.43	0-1	n.s
Glucose (mg/dL)	120	57-250	120.50	77-198	n.s
Creatinine (mg/dL) <sup>††</sup>	0.20	0.10-0.30	0.20	0.10-0.40	n.s
Uric acid (mg/dL)	0.83	0-3	0.62	0-2	< 0.05
Urea (mg/dL)	109.50	43-236	281	139-388	< 0.001
Total bilirubin (mg/dL) <sup>†</sup>	0.07	0.03-0.31	0.07	0.03-0.41	n.s
Total cholesterol (mg/dL)	105	61-253	134.5	65-250	< 0.05
Triglyceride (mg/dL)	10.50	1-56	121	11-516	< 0.001
ALT (UI/L) <sup>††</sup>	1	1-53	2	1-17	n.s
AST (UI/L) <sup>†</sup>	155.50	69-971	159	80-406	n.s
ALP (UI/L)	17.50	9-63	20.50	10-34	n.s
LDH (UI/L) <sup>††</sup>	2	1-21	2	1-6	n.s
GGT (UI/L) <sup>††</sup>	1	1-2	1	0-2	n.s
CPK (UI/L) <sup>††</sup>	914.50	17-14448	538.50	154-9786	< 0.01
Amylase (UI/L)	402	49-787	469.42	79-747	< 0.01
Lipase (UI/L) <sup>††</sup>	4	1-45	6.5	1-45	n.s
Sodium (mmol/L)	156	114-176	158	149-172	n.s
Potassium (mmol/L)	3.80	3-6	3.70	3-5	n.s
Na: K ratio	42.72	29-54	42.54	34-53	n.s
Chloride (mmol/L)	121	91-133	118	108-132	n.s
Calcium (mg/dL) <sup>†</sup>	4.35	3-10	6.80	5-8	< 0.001
Phosphorus (mg/dL)	8.15	6-12	7.30	4-13	n.s
Magnesium (mg/dL)	6.67	3-8	6.07	4-8	n.s

<sup>†</sup>Initial paired data set not normally distributed; <sup>‡</sup>Convalescent paired data set not normally distributed;

\*Convalescent body condition was calculated with initial SCL data

**Table 24.** Positive or negative Spearman correlation coefficient of select OCPs, PCBs and PAHs with hematological and plasma biochemical health parameters of juvenile loggerhead sea turtles (n = 30). Number in cells indicates the positive or negative correlation and the p-value (< 0.05).

Health parameters	HBC	<i>p,p'</i> -DDE	ΣOCPs	28	118	153
PCV (%)	-0.41 (0.03)	-0.44 (0.02)	-0.43 (0.02)			
RBC	-0.46 (0.01)	-0.42 (0.03)	-0.43 (0.02)			
Heterophils						
Triglyceride					-0.41 (0.03)	
ALT						
ALP						
LDH						
GGT						0.5 (0.009)
CPK						
Amylase				-0.51 (0.007)	-0.42 (0.02)	
Phosphorus						
Magnesium					-0.43 (0.02)	

**Table 25.** Statistically significant correlations of inorganic contaminants with hematological and plasma biochemical health parameters of juvenile loggerhead sea turtles from Canary Islands (n = 22). Number in cells indicates the positive or negative correlation and the p-value (< 0.05).

Health parameters	Cu	Mn	Pb	Zn	Cd
PVC (%)		-0.3 (0.04)			
RBC					
WBC	0.5 (0.003)	0.3 (0.04)			
Trombocyte	0.4 (0.03)		0.4 (0.02)		
Total protein					
Creatinine			0.4 (0.01)		
Uric acid				0.4 (0.03)	
AST					
LDH					
CPK		-0.6 (0.001)			-0.4 (0.04)
Amylase	-0.4 (0.01)	-0.4 (0.000)	-0.4 (0.04)		
Chloride			-0.4 (0.003)		
Calcium	-0.6 (0.000)			-0.6 (0.000)	
Phosphorus		0.4 (0.04)			
Magnesium	-0.4 (0.04)		-0.5 (0.003)	-0.4 (0.03)	

180	$\Sigma$ M-PCBs	$\Sigma$ DL-PCBs	$\Sigma$ PCBs	Phenanthrene	Pyrene	$\Sigma$ PAHs
				-0.45 (0.02)		
						-0.45 (0.02)
-0.42 (0.03)						
					0.40 (0.03)	
-0.51 (0.01)						0.46 (0.01)
					-0.41 (0.03)	
	-0.39 (0.04)		-0.39 (0.04)			
						0.41 (0.03)
	-0.43 (0.02)	-0.48 (0.01)	-0.43 (0.02)			

Ni	Cr	As	Al	Se	Hg
				0.4 (0.03)	
0.5 (0.003)	0.5 (0.009)	0.4 (0.02)			0.5 (0.004)
	-0.4 (0.03)				
			-0.4 (0.03)		
				0.4 (0.02)	
	-0.4 (0.03)	-0.4 (0.01)			-0.3 (0.04)
					-0.4 (0.03)
-0.5 (0.007)	-0.5 (0.004)	-0.6 (0.000)	-0.4 (0.01)		-0.4 (0.03)
	-0.4 (0.04)				-0.4 (0.01)

The fact that all plasma samples in this study had detectable values of some type of PAH reveals the prevalence of these contaminants in aquatic ecosystems.

Among several studies on metal accumulation in sea turtles from different areas of the world (Anan et al., 2001; Franzellitti et al., 2004; Frias-Espericueta et al., 2006; García-Fernández et al., 2009; Gardner et al., 2006; Ikonomopoulou et al., 2011; Jerez et al., 2010; Sakai et al., 2000; Storelli and Marcotrigiano, 2003), only one reported metal concentrations in tissues from loggerhead turtles stranded in the Canary Islands (Torrent et al., 2004). Recently, Ley-Quiñonez et al. (2011) reported baseline metals values in blood of loggerhead turtles from Mexico. Blood metals concentrations in the present study were much lower than those reported in loggerheads (Ley-Quiñonez et al., 2011) and in other sea turtle species (Guirlet et al., 2008; Páez-Osuna et al., 2010a, b; van de Merwe et al., 2010; Wang, 2005). However, our results were similar to those reported by Kenyon et al. (2001). Zn and Se were the metals found at highest concentrations. The same pattern has been previously described in blood of marine turtles (Guirlet et al., 2008; Ley-Quiñonez et al., 2011).

## **Chemical contamination and evidence of lipid mobilization**

When sea turtles are debilitated, they generally become aphagic and mobilize stored lipids for energy (Keller et al., 2004a; Orós et al., 2009; van de Merwe et al., 2010). Previous studies showed that sea turtles stranded in the Canary Islands have disorders that may impede animals to eat correctly (Orós et al., 2005; 2012a; 2013). Therefore, higher plasma concentrations of some contaminants due to the mobilization of fat stores into bloodstream during the aphagic period were expected. However we only observed significant differences between initial and convalescent PCB plasma concentrations. Keller et al. (2007) observed in debilitated loggerhead turtles initial PCB concentrations 9-fold higher than those found in healthy turtles. Furthermore, in the present study, turtles with reduced BCI showed higher concentrations of PCB 153 and 156. Only one negative correlation between dieldrin and BCI has been previously reported (Keller et al., 2004c).

In the present study, the higher plasma concentrations of  $\Sigma$ OCPs and  $\Sigma$ PCBs observed in emaciated turtles emphasize that debilitated animals could mobilize lipid stores into bloodstream to achieve energy. Lipids are mobilized to meet energy demands, egg production and tissue maintenance. Previous studies reported a strong correlation between lipids in fat stores and blood OC levels in sea turtles (Keller et al., 2004a). On the contrary, lower Hg concentrations were observed in cachectic turtles in the present study. A recent study compared Hg concentrations in debilitated and healthy loggerhead turtles. The lack of differences between both groups suggested that Hg toxicity does not play a role in the debilitated loggerhead condition (Day et al., 2010).

Although no significant differences were observed between plasma concentrations of organochlorine contaminants from turtles that died versus those that survived, we found the maximum level of total contamination in a turtle that died by entanglement. However, the highest level of  $\Sigma$ PCB pollution was found in a turtle stranded by hook ingestion (1150.40 ng/ml). Also, the highest level of  $\Sigma$ OCPs was found in a turtle stranded by hook ingestion (17.40 ng/ml). All these turtles showed very severe signs of emaciation, suggesting that the mobilization of lipid stores can cause variations in the plasma concentrations of some contaminants. However, the sample size for this group of emaciated turtles is very small, so conclusions from these results must be interpreted with caution.

The no significant differences observed in the PAH concentrations of emaciated and no emaciated turtles was also observed by Camacho et al. (2012). This finding indicates that PAH concentrations in sea turtles are directly related to recent exposure to waters or food contaminated by PAHs. In addition, the no significant differences observed between initial and convalescent PAH plasma concentrations suggest that mobilization not occur in PAHs. Although PAHs are considered persistent organic pollutants, they are not lipophilic compounds and they can be metabolized by the liver. In fact, some higher trophic-level aquatic organisms can metabolize PAHs (Roscales et al., 2011) and their biomagnification in marine system is insignificant (Gray, 2002).

## **Correlations between contaminants and clinic health parameters**

Very few studies have reported association between persistent pollutants and clinical health parameters in sea turtles (Day et al., 2007; Innis et al., 2008; Keller et al., 2004c; Swarthout et al., 2010). However, studies of PAHs and their association with health parameters in sea turtles are very scarce (Camacho et al., 2013).

The clinical analyses on turtles undergoing rehabilitation are useful to evaluate the health status of the animals (Casal and Orós, 2009). Research and conservation efforts have provided many reference ranges of loggerhead blood parameters (Casal et al., 2009; Delgado et al., 2011; Flint et al., 2010; Gelli et al., 2009; Jacobson et al., 2007; Kakizoe et al., 2007; Stamper et al., 2005). The majority of the clinical convalescent parameters reported in Table 23 fell within the range of values reported for rehabilitated juvenile loggerheads (Casal et al., 2009) and free-ranging juvenile loggerheads (Deem et al., 2009; Delgado et al., 2011; Flint et al., 2010; Keller et al., 2004c). The higher WBC and heterophils percentage initial values and the lower PCV and RBC initial values were also observed by Casal and Orós (2009).

In the present study, indicators of anemia such as decreased PCV and RBC values were negatively correlated with HBC, *p,p'*-DDE,  $\Sigma$ OCPs, phenanthrene and Mn, suggesting that these contaminants could cause anemia in sea turtles. Keller et al. (2004c) reported a negative correlation between blood concentrations of chlordanes and DL-PCBs and RBC and PCV values in loggerheads, indicative of anemia. In addition, Bruckner et al. (1973) showed that exposure to PCBs in rats caused drop of the anemia indicators. Keller et al. (2004c) also observed positive correlations between most classes of OC pesticides and WBC counts and between mirex and the heterophil/lymphocyte ratio, suggesting modulation of the immune system. An elevation of this ratio is a common response to stressor factors in sea turtles (Aguirre et al., 1995). The results of Keller et al. (2006) suggested that the sea turtle immune system may be modulated by environmentally relevant concentrations of OCs. Subtle negative impacts on sea turtle immune function was also reported for inorganic contaminants such as Hg (Daly et al., 2007). The present study is the third to demonstrate significant correlations between metals levels and clinical health parameters (Daly et al., 2007; Innis et al., 2008). The positive correlation observed between WBC and Cu has been previously described (Innis et al., 2008).

Regarding the biochemical parameters, the lower values for plasma enzymes associated to higher contaminant concentrations were observed. A previous study also found a negative correlation between CPK and  $\Sigma$ PCBs (Swarthout et al., 2010). However, we also found positive correlations between blood enzymes (GGT and ALP) and contaminants. Keller et al. (2004c) observed a positive correlation between AST and OC concentrations, suggesting hepatocellular damage. Increase of CPK associated with higher levels of Hg was previously reported (Day et al., 2007; Innis et al., 2008). However, in the present study a negative correlation was detected between CPK and Hg. There are still many unknowns about the distributions of the enzymes among the different tissues in reptiles, particularly in sea turtles. This fact makes difficult to explain the observed correlations between plasma enzymes and contaminants.

The correlations observed between several clinical parameters (such as electrolytes, uric acid, total protein and creatinine) and contaminants concentrations could be associated with renal damage. It has been reported that chronic exposure to OCPs and PCBs could affect kidneys function (McConnell, 1985). In addition, heavy metals can induce renal damage in mammals (Confer and Panciera, 2001). The functions performed by reptilian kidneys include the osmoregulation. Salt glands are also involved in electrolyte balance in sea turtles and failure to maintain homeostasis due to severe lesions in the salt glands can cause stranding and/or death (Orós et al., 2011). A calcium: phosphorus ratio  $< 1$  can cause kidney disease in reptiles (Campbell, 2004). In the present study positive correlations between phosphorus values and  $\Sigma$ PAHs and Mn plasma concentrations were observed. In addition negative correlations between calcium values and metals (Cu, Zn, Ni, Cr, As, Al, Hg) plasma concentrations were also detected. Among all the correlations



between indicators of renal disorder and contaminants concentrations described in the literature (Day et al., 2007; Innis et al., 2008; Keller et al., 2004c; Swarthout et al., 2010), only the negative correlation observed between magnesium and PCBs reported by Keller et al. (2004c) is also supported in the present study.

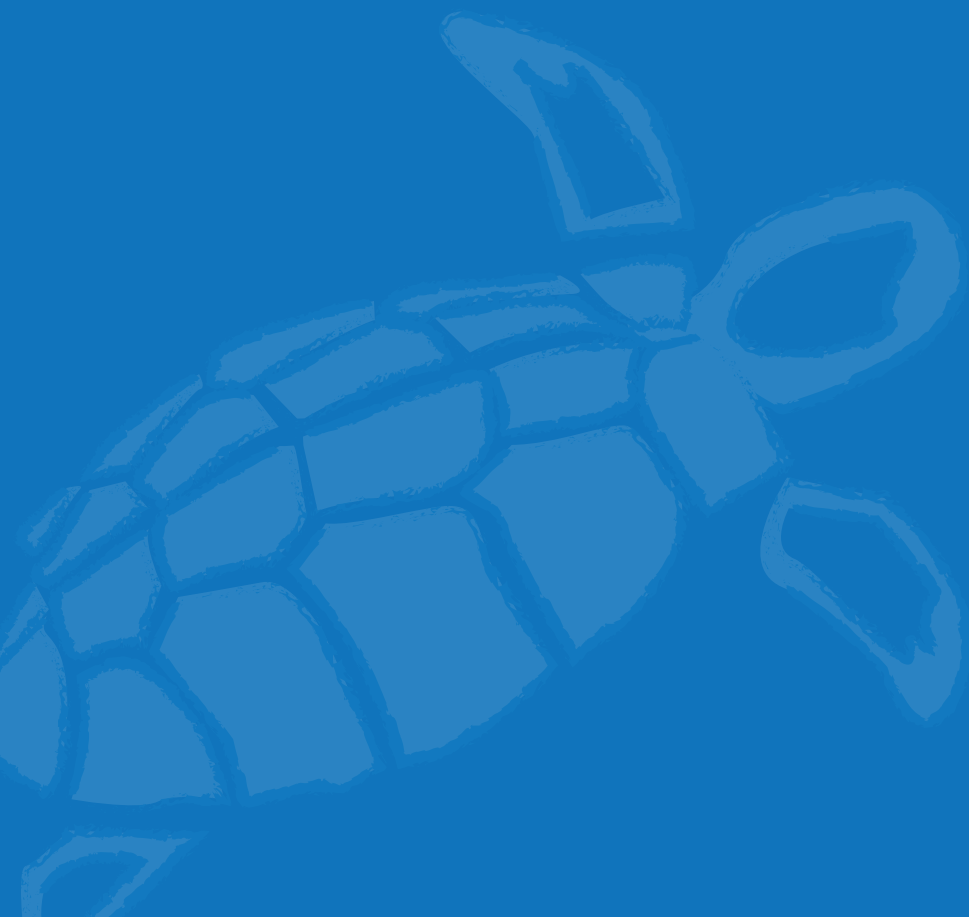
Although the individual variation of the clinical parameters among convalescent loggerhead sea turtles makes difficult to accurately explain all the results, this study provides valuable information on the effects of contaminants on clinical health parameters. We agree with Swarthout et al. (2010) that future studies on free ranging sea turtles would benefit from the development of more sensitive biomarkers to persistent pollutants.

## Conclusions

1. The present study represents the first evaluation of the potential effects of persistent organic pollutant and metals in loggerhead sea turtles undergoing rehabilitation.
2. Furthermore, it is the first time that pollution levels measured at different times of the rehabilitation of sea turtles.
3. Our results suggested that the mobilization of lipid stores can cause variations in the plasma concentrations of some contaminants. Cachectic animals showed significant higher concentrations of OCPs and PCBs.
4. Several associations between POP and metal levels and clinical parameters were found. Few previous studies have observed correlation between organochlorine contaminants and heavy metals with clinical parameters.



# CONCLUSIONES



**CONCLUSIONES**

.....241

## Conclusiones generales

1. Este trabajo recopila valores de referencia de gasometría y electrolitos de juveniles de tortuga boba. Además, proporciona valores de gases sanguíneos y valores bioquímicos en el momento del ingreso de las tortugas al hospital, mostrando que la mayor parte de las tortugas sufren algún tipo de trastorno asociado con el estado ácido-base. Estos datos son una esencial base para la aplicación de terapias de fluidos más apropiadas para las tortugas marinas.
2. Se describe por primera vez la adenitis de la glándula de sal como causa de varamiento en tortuga boba debido a la hipernatremia e hipercloremia que la lesión de la glándula origina.
3. Las mayores concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes en el plasma de tortugas juveniles de Canarias en comparación con hembras de Cabo Verde deben ser interpretadas teniendo en cuenta tres factores: un mayor grado de desarrollo industrial en el Archipiélago canario, la comparación de grupos de tortuga de diferente edad (juveniles vs. adultas) y el estado de las tortugas juveniles varadas en el momento de la toma de la muestra.
4. Contrario al resultado esperado, las tortugas juveniles más pequeñas mostraron una mayor concentración de congéneres de bifenilos policlorados que las tortugas más grandes de las Islas Canarias. Nosotros apoyamos el efecto de dilución con el crecimiento como una posible explicación a esta diferencia. Cabe destacar que el aumento de las concentraciones de contaminantes orgánicos persistentes en Canarias en los últimos años del estudio puede estar relacionado con un incremento de la contaminación marina.

5. Las mayores concentraciones de contaminantes organoclorados y algunos metales detectadas en tortugas en el momento del ingreso al hospital, sugieren que la movilización de los depósitos de lípidos puede causar variaciones en las concentraciones plasmáticas - sanguíneas de algunos contaminantes. En esta línea, los animales que ingresaron con evidentes signos de caquexia presentaron concentraciones significativamente mayores de organoclorados en el momento del ingreso.

6. Aunque nuestros resultados señalan diferencias significativas en varias concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos en las poblaciones estudiadas, el predominio de hidrocarburos con dos y tres anillos aromáticos en ambas poblaciones sugiere un origen petrogénico. Además, la correlación negativa entre el tamaño de las tortugas juveniles y la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos sugiere igualmente que el proceso de bioacumulación no ocurre en estas especies. Además, la ausencia de variaciones significativas entre las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos durante el proceso de rehabilitación indica que estos contaminantes podrían ser ampliamente metabolizados en esta especie.

7. En general las tortugas adultas de Cabo Verde presentaron menores niveles de contaminantes inorgánicos persistentes que en otras zonas geográficas reflejando una menor exposición a estos contaminantes en esta zona.

8. Las asociaciones entre las concentraciones de contaminantes tóxicos persistentes y los parámetros clínicos sugieren que los contaminantes tóxicos persistentes podrían estar causando efectos negativos sobre la salud de las tortugas (anemia, afectación del sistema inmune, daño renal y metabólico).

9. Nuestro estudio refuerza la utilidad de la sangre como una excelente muestra para la detección de contaminantes tóxicos persistentes en tortugas marinas vivas de una forma no letal y relativamente no invasiva.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Referencias bibliográficas

2. Referencias electrónicas



<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	245
1. Referencias bibliográficas .....	247
2. Referencias electrónicas .....	275



# 1. Referencias bibliográficas

- Abhilash, P.C., Singh, N., 2009. Pesticide use and application: an Indian scenario. *J Hazard Mater* 165, 1-12.
- Aguilar, A., 1984. Relationships of 4,4'-DDE/4,4'-DDT in marine mammals to the chronology of 4,4'-DDT input into ecosystems. *Can J Fish Aquat Sci* 41, 840-844.
- Aguilar, A., 1985. Compartmentation and reliability of sampling procedures in organochlorine pollution surveys of cetaceans. *Residue Rev* 95, 91-114.
- Aguilar, A., Borrell, A., Pastor, T., 1999. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. *J Cet Res Manag, Special Issue* 1, 83-116.
- Aguilar, A., Borrell, A., 1990. Patterns of lipid content and stratification in the blubber of fin 10 whales (*Balaenoptera physalus*). *J Mammal* 71, 544-554.
- Aguilar, A., Borrell, A., 1994a. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Sci Total Environ* 154, 237-247.
- Aguilar, A., Borrell, A., 1994b. Reproductive transfer and variation of body load of organochlorine pollutants with age in fin whales (*Balaenoptera physalus*). *Arch Environ Contam Toxicol* 27, 546-554.
- Aguilar, A., Borrell, A., Reijnders, P.J.H., 2002. Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Mar Environ Res* 53, 425-452.
- Aguirre, A.A., 1996. Plasma biochemistry values of green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas in the Hawaiian Islands. Southwest Fisheries Science Center. Administ Report H-96-10C.
- Aguirre, A.A., Balazs, G.H., Spraker, T.R., Gross, T.S., 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiol Zool* 68, 831-854.
- Aguirre, A.A., Balazs, G.H., Zimmerman, B., Galey, F.D., 1994. Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. *Mar Poll Bull* 28, 109-114.
- Alam, S.K., Brim, M.S., 2000. Organochlorine, PCB, PAH, and metal concentrations in eggs of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from northwest Florida, USA. *J Environ Sci Health B* 35, 705-724.
- Alava, J.J., Keller, J.M., Kucklick, J.R., Wynneken, J., Crowder, L., Scott, G.I., 2006. Loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) egg yolk concentrations of persistent organic pollutants and lipid increase during the last stage of embryonic development. *Sci Total Environ* 367, 170-181.

- Alava, J.J., Keller, J.M., Wyneken, J., Crowder, L., Scott, G., Kucklick, J.R., 2011. Geographical variation of persistent organic pollutants in eggs of threatened loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from southeastern United States. *Environ Toxicol Chem* 30, 1677-1688.
- Albers, P.H., 1984. Effects of oil and dispersants on birds, Region 9 Oil Dispersants Workshop, U.S. Coast Guard, Santa Barbara, California, USA, p. 101.
- Albers, P.H., Sileo, L., Mulhern, B.M., 1986. Effects of environmental contaminants on snapping turtles of a tidal wetland. *Arch Environ Contam Toxicol* 15, 39-49.
- Anan, Y., Kunito, T., Watanabe, I., Sakai, H., Tanabe, S., 2001. Trace element accumulation in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Japan. *Environ Toxicol Chem* 20, 2802-2814.
- Anderson, E.T., Harms, C.A., Stringer, E.M., Cluse, W.M., 2011. Evaluation of hematology and serum biochemistry of cold-stunned green sea turtles (*Chelonia mydas*) in North Carolina, USA. *J Zoo Wildl Med* 42, 247-255.
- Andreani, G., Santoro, M., Cottignoli, S., Fabbri, M., Carpene, E., Isani, G., 2008. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Sci Total Environ* 390, 287-294.
- Ankley, G.T., Collyard, S.A., Monson, P.D., Kosian, P.A., 1994. Influence of ultraviolet light on the toxicity of sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 13, 1791-1796.
- Ankley, G.T., Giesy, J.P., 1998. *Endocrine Disruptors in Wildlife: A Weight of Evidence Perspective*. SETAC Press, Pensacola, USA.
- Arnold, D.L., Mes, J., Bryce, F., Karpinski, K., Bickis, M.G., Zawadzka, Z.Z., Stapley, R., 1990. A pilot study on the effects of Aroclor 1254 ingestion by rhesus and cynomolgus monkeys as a model for human ingestion of PCBs. *Food Chem Toxicol* 28, 847-857.
- Ashpole, S.L., Bishop, C.A., Brooks, R.J., 2004. Contaminant residues in snapping turtle (*Chelydra s. serpentina*) eggs from the Great Lakes-St. Lawrence River basin (1999 to 2000). *Arch Environ Contam Toxicol* 47, 240-252.
- Bacci, E., 1989. Mercury in the Mediterranean. *Mar Pollut Bull* 20, 317-338.
- Backer, L.C., Grindem, C.B., Corbett, W.T., Cullins, L., Hunter, J.L., 2001. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci Total Environ* 274, 161-169.
- Balazs, G.H., Poley, S.G., 1991. Research plan for marine turtle fibropapiloma. US Department of Commerce/National Oceanic & Atmospheric Administration/National Marine Fisheries Service. NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-156. Honolulu, Hawaii, p. 113.
- Baldwin, R., Hughes, G., Prince, R.I.T., 2003. Loggerhead turtles in the Indian Ocean. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 218-232.
- Bansel, S.K., Verma, S.R., Gupta, A.K., Dalela, R.C., 1979. Physiological dysfunction of the haemopoietic system in a fresh water teleost, *Labeo rohita*, following chronic chlordan exposure. Part II-Alterations in certain organic components and serum electrolytes. *Bull Environ Contam Toxicol* 22, 674-680.
- Barbieri, E., 2009a. Concentration of heavy metals in tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) sampled in the Cananéia Estuary, Brazil. *Braz J Oceanogr* 57, 243-248.
- Barbieri, E., 2009b. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Perez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicol* 18, 312-318.
- Barrows, M., McArthur, S., Wilkinson, R., 2004. Diagnosis. In: McArthur, S., Wilkinson, R., Meyer, J. (Eds.), *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 109-140.
- Baumann, P.C., 1989. PAH, metabolites, and neoplasia in feral fish populations, in metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Beckman, K.B., Ylitalo, G.M., Towell, R.G., Krahn, M.M., O'hara, T.M., Blake, J.E., 1999. Factors affecting organochlorine contaminant concentrations in milk and blood of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) dams and pups from St. George Island, Alaska. *Sci Total Environ* 231, 183-200.
- Beineke, A., Siebert, U., Wohlsein, P., Baumgartner, W., 2010. Immunology of whales and dolphins. *Vet Immunol Immunopat* 133, 81-94.

- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P., 1997. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Mar Poll Bull* 34, 298-305.
- Bentley, P.J., Dunbar-Cooper, A., 1980. A blood sampling technique for sea turtles., Contract Na-80-GE-A-00082 for the National Marine Fisheries Service of United States of America.
- Bergeron, C.M., Husak, J.E., Unrine, J.M., Romanek, C.S., Hopkins, W.A., 2007. Influence of feeding ecology on blood mercury concentrations in four species of turtles. *Environ Toxicol Chem* 26, 1733-1741.
- Bergeron, J.M., Crews, D., McLachlan, J.A., 1994. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ Health Perspect* 102, 780-781.
- Bernanke, J., Kohler, H.R., 2009. The impact of environmental chemicals on wildlife vertebrates. *Rev Environ Contam Toxicol* 198, 1-47.
- Bernard, H.J., Hohn, A.A., 1989. Differences in feeding habits between pregnant and lactating spotted dolphins (*Stenella attenuata*). *J Mammal* 70, 211-215.
- Bernhoft, A., Skaare, J.U., 1994. Levels of selected individual polychlorinated biphenyls in different tissues of harbour seals (*Phoca vitulina*) from the Southern coast of Norway. *Environ Poll* 86, 99-107.
- Bishop, C.A., Brooks, R.J., Carey, J.H., Ng, P., Norstrom, R.J., Lean, D.R., 1991. The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from Ontario, Canada. *J Toxicol Environ Health* 33, 521-547.
- Bishop, C.A., Brown, G.P., Brooks, R.J., Lean, D.R.S., Carey, J.H., 1994. Organochlorine contaminant concentrations in eggs and their relationship to body size, and clutch characteristics of the female common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) in Lake Ontario, Canada. *Arch Environ Contam Toxicol* 27, 82-87.
- Bishop, C.A., Gendron, A.D., 1998. Reptiles and amphibians: shy and sensitive vertebrates of the Great Lakes basin and St. Lawrence River basin. *Environ Monitor Assess* 53, 225-244.
- Bishop, C.A., Lean, D.R.S., Brooks, R.J., Carey, J.H., Ng, P., 1995. Chlorinated hydrocarbons in early life stages of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from a coastal wetland on Lake Ontario, Canada. *Environ Toxicol Chem* 14, 421-426.
- Bishop, C.A., Ng, P., Norstrom, R.J., Brooks, R.J., Pettit, K.E., 1996. Temporal and geographic variation of organochlorine residues in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) (1981-1991) and comparisons to trends in the herring gull (*Larus argentatus*) in the Great Lakes basin in Ontario, Canada. *Arch Environ Contam Toxicol* 31, 512-524.
- Bjorndal, K.A., 1997. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 199-232.
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Bennett, R.A., Jacobson, E.R., Wronski, T.J., Valeski, J.J., Eliazar, P.J., 1998. Age and growth in sea turtles: limitations of skeletochronology for demographic studies. *Copeia* 1, 23-30.
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Chaloupka, M.Y., 2000a. Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence. *Ecol Appl* 10, 269-282.
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Dellinger, T., Delgado, C., Martins, H.R., 2003. Compensatory growth in oceanic loggerhead sea turtles: response to a stochastic environment. *Ecology* 84, 1237-1249.
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Koike, B., Schroeder, B.A., Shaver, D.I., Teas, W.G., Witzell, W.N., 2001. Somatic growth function for immature loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in southeastern US waters - Statistical Data Included. *Fish Bull* 99, 240-246.
- Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Martins, H.R., 2000b. Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Mar Ecol Prog Ser* 202, 265-272.
- Bolten, A.B., 2003a. Active Swimmers-passive drifters: the oceanic juvenile stage of loggerheads in the Atlantic System. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 63-78.
- Bolten, A.B., 2003b. The loggerhead sea turtle – a most excellent fish. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 7-27.
- Bolten, A.B., 2003c. Variation in sea turtle history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages. In: Lutz, P.L., Musick, J.A., Wyneken, J. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles II*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 243-258.

- Bolten, A.B., Bjorndal, K.A., 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. *J Wildl Dis* 28, 407-413.
- Bolten, A.B., Bjorndal, K.A., Martins, H.R., Dellinger, T., Biscoito, M.J., Encalada, S.E., Bowen, B.W., 1998. Transatlantic developmental migrations of loggerhead sea turtles demonstrated by mtDNA sequence analysis. *Ecolog Applicat* 8, 1-7.
- Bolten, A.B., Jacobson, E.R., Bjorndal, K.A., 1992. Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Am J Vet Res* 53, 2224-2227.
- Boll, M., Weber, L.W., Messner, B., Stampfl, A., 1998. Polychlorinated biphenyls affect the activities of gluconeogenic and lipogenic enzymes in rat liver: is there an interference with regulatory hormone actions? *Xenobiotica* 28, 479-492.
- Borgå, K., Fisk, A.T., Hoekstra, P.E., Muir, D.C., 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environ Toxicol Chem* 23, 2367-2385.
- Bowen, B.W., Avise, J.C., Richardson, J.I., Meylan, A.B., Margaritoulis, D., Hopkins-Murphy, S.R., 1993. Population structure of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the northwestern Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Conserv Biol* 7, 834-844.
- Bowen, B.W., Bass, A.L., Soares, L., Toonen, R.J., 2005. Conservation implications of complex population structure: lessons from the loggerhead turtle (*Caretta caretta*). *Molec Ecol* 14, 2389-2402.
- Bowen, B.W., Kamezaki, N., Limpus, C.J., Hughes, G.R., Meylan, A.B., Avise, J.C., 1994. Global phylogeography of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) as indicated by mitochondrial DNA haplotypes. *Evolution* 48, 1820-1828.
- Bowen, B.W., Karl, S.A., 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molec Ecol* 16, 4886-4907.
- Bradley, R.W., Sprague, J.B., 1985. Accumulation of zinc by rainbow trout as influenced by pH, water hardness and fish size. *Environ Toxicol Chem* 4, 685-694.
- Bradley, T.A., Norton, T.M., Latimer, K.S., 1998. Hemogram values, morphological characteristics of blood cells and morphometric study of loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in the first year of life. *Bull Assoc Rept Amph Vet* 8, 8-16.
- Braune, B.M., Outridge, P.M., Fisk, A.T., Muir, D.C., Helm, P.A., Hobbs, K., Hoekstra, P.F., Kuzyk, Z.A., Kwan, M., Letcher, R.J., Lockhart, W.L., Norstrom, R.J., Stern, G.A., Stirling, I., 2005. Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: an overview of spatial and temporal trends. *Sci Total Environ* 351-352, 4-56.
- Brenner, D., Lewbart, G., Stebbins, M., Herman, D.W., 2002. Health survey of wild and captive bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) in North Carolina and Virginia. *J Zoo Wildl Med* 33, 311-316.
- Brodie, P.F., 1975. Cetacean energetics, an overview of intraspecific size variation. *Ecology* 56, 152-161.
- Brown, M.P., Werner, M.B., Sloan, R.J., Simpson, K.W., 1985. Polychlorinated biphenyls in the Hudson River. *Environ Sci Technol* 19, 656-661.
- Bruckner, J.V., Khanna, K.L., Cornish, H.H., 1973. Biological responses of the rat to polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol* 24, 434-448.
- Brunstom, B., Orberg, J., 1982. A method for studying embryotoxicity of lipophilic substances experimentally introduced into hens' eggs. *Ambio* 11, 209-211.
- Brunstrom, B., Broman, D., Näf, C., 1991. Toxicity and EROD-inducing potency of 24 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in chick embryos. *Arch Toxicol* 65, 485-489.
- Bryan, A.M., Olafsson, P.G., Stone, W.B., 1987. Disposition of low and high environmental concentrations of PCBs in snapping turtle tissues. *Bull Environ Contam Toxicol* 38, 1000-1005.
- Bryan, G.W., Langston, W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ Pollut* 76, 89-131.
- Calabuig, P., Liria, A., 2007. Recovery of marine turtles injured in the waters of the Canary Islands Archipelago (Spain) between 1998 and 2003. In: López-Jurado, L.F., Liria Loza, A. (Eds.), *Marine turtles. Recovery of extinct populations*, Monografía del Instituto Canario de Ciencias Marinas. Pérez-Galdós, S.L.U., Gran Canaria, pp. 77-94.
- Calvert, J.H., 1987. Pheasant poisoning by swallowing shot. *The Field* 47 1208, 189.

- Camacho, M., Boada, L.D., Orós, J., Calabuig, P., Zumbado, M., Luzardo, O.P., 2012. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Mar Pollut Bull* 64, 1974-1980.
- Camacho, M., Calabuig, P., Luzardo, O.P., Boada, L.D., Zumbado, M., Orós, J., 2013a. Crude Oil as a Stranding Cause among Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) in the Canary Islands, Spain (1998–2011). *J Wildl Dis* 49 (3), 637–640.
- Camacho, M., Luzardo, O.P., Boada, L.D., López Jurado, L.F., Medina, M., Zumbado, M., Orós, J., 2013b. Potential adverse health effects of persistent organic pollutants on sea turtles: Evidences from a cross-sectional study on Cape Verde loggerhead sea turtles. *Sci Total Environ* 458-460C, 283-289.
- Camacho, M., Quintana, M.P., Luzardo, O.P., Estévez, M.D., Calabuig, P., Orós, J., 2013c. Metabolic and respiratory status of stranded juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): 66 cases (2008-2009). *J Am Vet Med Assoc* 242, 396-401.
- Campbell, K.R., Campbell, T.S., 2002. A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. *Environ Toxicol Chem* 21, 894-898.
- Campbell, T.W., 1988. Avian hematology and cytology. Iowa State University Press, Ames, USA, pp. 3-17.
- Campbell, T.W., 1996. Clinical pathology. In: Mader, D.R. (Ed.), *Reptile Medicine and Surgery*. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 248-257.
- Campbell, T.W., 2004. Hematology of reptiles. In: Thrall, M.A. (Ed.), *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 259-276.
- Canfield, P.J., 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Aust Vet J* 76, 793-800.
- Capelli, R.A., Drava, G.A., De Pellegrini, R.A., Minganti, V.A., Poggi, R.B., 2000. Study of trace elements in organs and tissues of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) found dead along the Ligurian coasts (Italy). *Adv Environ Res* 4, 31–42.
- Cardellicchio, N., Decataldo, A., Di, L.A., Misino, A., 2002. Accumulation and tissue distribution of mercury and selenium in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean Sea (southern Italy). *Environ Pollut* 116, 265-271.
- Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Ragone, P., Di Leo, A., 2000. Tissue distribution of metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Apulian coasts, southern Italy. *Mar Environ Res* 49, 55-66.
- Carere, C., Costantini, D., Sorace, A., Santucci, D., Alleva, E., 2010. Bird populations as sentinels of endocrine disrupting chemicals. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 46, 81-88.
- Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: part I. low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem* 18, 481-493.
- Carlson, R.W., Duby, R.T., 1973. Embryotoxic effects of three PCB'S in the chicken. *Bull Environ Contam Toxicol* 9, 261-266.
- Carpenter, K.E., Abrar, M., Aeby, G., Aronson, R.B., Banks, S., Bruckner, A., Chiriboga, A., Cortes, J., Delbeek, J.C., Devantier, L., et al., 2008. One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science* 321, 560-563.
- Carr, A., 1986. Rips, FADS, and little loggerheads. *BioScience* 36, 92-100.
- Carr, A., 1987. New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. *Conserv Biol* 1, 103-120.
- Carreras, C., Pascual, M., Cardona, L., Aguilar, A., Margaritoulis, D., Rees, A., Turkozán, O., Levy, Y., Gasith, A., Aureggi, M., Khalil, M., 2007. The genetic structure of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in the Mediterranean as revealed by nuclear and mitochondrial DNA and its conservation implications. *Conserv Gen* 8, 761-775.
- Carson, R., Darling, L., Darling, L., 1962. *Silent spring*. Houghton Mifflin; Riverside Press, Boston and Cambridge, Massachusetts, UK.
- Casal, A.B., Camacho, M., López-Jurado, L.F., Juste, C., Orós, J., 2009. Comparative study of hematologic and plasma biochemical variables in Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Vet Clin Pathol* 38, 213-218.

- Casal, A.B., Orós, J., 2009. Plasma biochemistry and haematology values in juvenile loggerhead sea turtles undergoing rehabilitation. *Vet Rec* 164, 663-665.
- Caurant, F., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Sauriau, P.G., 1994. Ecological and biological factors controlling the concentrations of trace elements (As, Cd, Cu, Hg, Se, Zn) in delphinids from the North Atlantic Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 103, 207-219.
- Caurant, F., Bustamante, P., Bordes, M., Miramand, P., 1999. Bioaccumulation of cadmium, copper and zinc in some tissues of three species of marine turtles stranded along the French Atlantic Coasts. *Mar Poll Bull* 38, 1085-1091.
- Caut, S., Guirlet, E., Jouquet, P., Girondot, M., 2006. Influence of nest location and yolkless eggs on the hatching success of leatherback turtle clutches in French Guiana. *Can J Zool – Rev Can Zool* 84, 908-915.
- Cejudo, D., Varo, N., López, O., López Jurado, L.F., 2008. Satellite tracking of adult loggerheads (*Caretta caretta*) around waters of Cape Verde archipelago (western Africa). *Proceedings of the Twenty-Fourth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, p. 189.
- Clarke, M.R., Martins, H.R., Pascoe, P., 1993. The diet of sperm whales (*Physeter macrocephalus* Linnaeus 1758) of the Azores. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biol Sci* 339, 67-82.
- Coats, J.R., 1990. Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ Health Perspect* 87, 255-262.
- Cockcroft, V.G., De Kock, A.C., Lord, D.A., Ross, G.J.B., 1989. Organochlorines in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the east coast of South Africa. *Afr J Mar Sci* 8, 207-217.
- Colborn, T., 2002. Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3, 363-367.
- Colborn, T., Clement, C., 1992. *Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. Princeton Scientific Publishing, Princeton, New Jersey, USA.
- Colborn, T., Smolen, M.J., 1996. Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans. *Rev Environ Contam Toxicol* 146, 91-172.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101, 378-384.
- Collins, J.F., Brown, J.P., Alexeeff, G.V., Salmon, A.G., 1998. Potency equivalency factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. *Regul Toxicol Pharmacol* 28, 45-54.
- Confer, A.W., Panciera, R.J., 2001. The urinary system. In: McGavin, M.D., Carlton, W.W., Zachary, J.F. (Eds.), *Thomson's Special Veterinary Pathology*, Mosby, St. Louis, Missouri, USA, pp. 235-277.
- Corsolini, S., Aurigi, S., Focardi, S., 2000. Presence of polychlorobiphenyls (PCBs) and coplanar congeners in the tissues of the Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Mar Pollut Bull* 40 (11), 952-960.
- Crain, D.A., Guillette, L.J., Jr., 1998. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Ani Reprod Sci* 53, 77-86.
- Crain, D.A., Guillette, L.J., Jr., Rooney, A.A., Pickford, D.B., 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ Health Perspect* 105, 528-533.
- Cray, C., Varella, R., Bossart, G.D., Lutz, P., 2001. Altered in vitro immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *J Zoo Wildl Med* 32, 436-440.
- Crews, D., Bergeron, J.M., McLachlan, J.A., 1995. The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs. *Environ Health Perspect* 103, 73-77.
- Crews, D., Willingham, E., Skipper, J.K., 2000. Endocrine disruptors: present issues, future directions. *Quarterly Rev Biol* 75, 243-260.
- Cuadrado, M., Diaz-Paniagua, C., Quevedo, M.A., Aguilar, J.M., Prescott, I.M., 2002. Hematology and clinical chemistry in dystocic and healthy post-reproductive female chameleons. *J Wildl Dis* 38, 395-401.
- Chaloupka, M.Y., Limpus, C.J., 1997. Robust statistical modelling of hawksbill sea turtle growth rates (southern Great Barrier Reef). *Mar Ecol Prog Ser* 146, 1-8.

- Chandavar, V.R., Naik, P.R., 2004. Variation in plasma glucose and pancreatic  $\beta$  cells in the turtle, *Lissemys punctata* (Order: Chelonia; Family: Trionychidae). *Acta Zool* 85, 113–118.
- Chang, S., Zdanowicz, V.S., Murchelano, R.A., 1998. Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries, ICES. *J Mar Sci* 55, 954.
- Chatterjee, R., 2007. E-waste recycling spews dioxins into the air. *Environ Sci Technol* 41, 5577.
- Chaverri, D.C., 2001. El Papel Cultural y Económico de las Tortugas Marinas en Conservación de Tortugas Marinas en la Región del Gran Caribe - Un Diálogo para el Manejo Regional Efectivo. In: Eckert, K.L., Abreu, F.A. (Eds.), WIDECAS, UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas (MTSG). WWF y el Programa Ambiental del Caribe del PNUMA, pp. 19-24.
- Christopher, M.M., 1999. Physical and biochemical abnormalities associated with prolonged entrapment in a desert tortoise. *J Wildl Dis* 35, 361-366.
- Christopher, M.M., Berry, K.H., Henen, B.T., Nagy, K.A., 2003. Clinical disease and laboratory abnormalities in free-ranging desert tortoises in California (1990-1995). *J Wildl Dis* 39, 35-56.
- Chu, I., Villeneuve, D.C., Yagminas, A., LeCavalier, P., Poon, R., Feeley, M., Kennedy, S.W., Seegal, R.F., Hakansson, H., Ahlborg, U.G., et al., 1994. Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. I. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological changes. *Soc Toxicology* 22, 457-468.
- D'Illio, S., Mattei, D., Blasi, M.F., Alimonti, A., Bogjalli, S., 2011. The occurrence of chemical elements and POPs in loggerhead turtles (*Caretta caretta*): an overview. *Mar Pollut Bull* 62, 1606-1615.
- Dabrowska, H., Fisher, S.W., Estenik, J., Kidekhel, R., Stromberg, P., 2006. Polychlorinated biphenyl concentrations, congener profiles, and ratios in the fat tissue, eggs, and plasma of snapping turtles (*Chelydra s. serpentina*) from the Ohio Basin of Lake Erie, USA. *Arch Environ Contam Toxicol* 51, 270-286.
- Daly, G.L., Lei, Y.D., Teixeira, C., Muir, D.C., Castillo, L.E., Jantunen, L.M., Wania, F., 2007. Organochlorine pesticides in the soils and atmosphere of Costa Rica. *Environ Sci Technol* 41, 1124-1130.
- Das, K., Siebert, U., Gillet, A., Dupont, A., Di-Poi, C., Fonfara, S., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., De Pauw-Gillet, M.C., 2008. Mercury immune toxicity in harbour seals: links to in vitro toxicity. *J Environ Health* 7, 52.
- Davenport, J., 1997. Temperature and the life-history strategies of sea turtles. *J Therm Biol* 22, 479-488.
- Davies, K., 2006. Strategies for eliminating and reducing persistent bioaccumulative toxic substances: common approaches, emerging trends, and level of success. *J Environ Health* 69, 9-15, 36, 38.
- Day, R.D., 2003. Mercury in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*: Developing monitoring strategies, investigating factors affecting contamination, and assessing health impacts. MS Thesis, Grice Marine Laboratory, College of Charleston, Charleston, South Carolina, p. 133.
- Day, R.D., Christopher, S.J., Becker, P.R., Whitaker, D.W., 2005. Monitoring mercury in the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Environ Sci Technol* 39, 437-446.
- Day, R.D., Keller, J.M., Harms, C.A., Segars, A.L., Cluse, W.M., Godfrey, M.H., Lee, A.M., Peden-Adams, M., Thorvalson, K., Dodd, M., Norton, T., 2010. Comparison of mercury burdens in chronically debilitated and healthy loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *J Wildl Dis* 46, 111-117.
- Day, R.D., Segars, A.L., Arendt, M.D., Lee, A.M., Peden-Adams, M.M., 2007. Relationship of blood mercury levels to health parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Environ Health Perspect* 115, 1421-1428.
- De Guise, S., Lagace, A., Beland, P., 1994. True hermaphroditism in a St. Lawrence beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *J Wildl Dis* 30, 287-290.
- De Guise, S., Martineau, D., Beland, P., Fournier, M., 1995. Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4, 73-77.
- de Solla, S.R., Bishop, C.A., Brooks, R.J., 2002. Sexually dimorphic morphology of hatchling snapping turtles (*Chelydra serpentina*) from contaminated and reference sites in the Great Lakes and St. Lawrence River basin, North America. *Environ Toxicol Chem* 21, 922-929.

- de Solla, S.R., Bishop, C.A., Van der Kraak, G., Brooks, R.J., 1998. Impact of organochlorine contamination on levels of sex hormones and external morphology of common snapping turtles (*Chelydra serpentina serpentina*) in Ontario, Canada. *Environ Health Perspect* 106, 253-260.
- de Solla, S.R., Fernie, K.J., 2004. Characterization of contaminants in snapping turtles (*Chelydra serpentina*) from Canadian Lake Erie Areas of Concern: St. Clair River, Detroit River, and Wheatley Harbour. *Environ Pollut* 132, 101-112.
- De Voogt, P., Brinkman, U.A.T., 1989. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: Kimlbrough, R., Jensen, S. (Eds.), *Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products*. Elsevier, Amsterdam, pp. 3-45.
- Debier, C., Chalon, C., Le Boeuf, B.J., de Tillesse, T., Larondelle, Y., Thome, J.P., 2006. Mobilization of PCBs from blubber to blood in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) during the post-weaning fast. *Aquat Toxicol* 80, 149-157.
- Debier, C., Pomeroy, P.P., Dupont, C., Joiris, C., Comblin, V., Le Boulenge, E., Larondelle, Y., Thome, J.P., 2003a. Dynamics of PCB transfer from mother to pup during lactation in UK grey seals *Halichoerus grypus*: differences in PCB profile between compartments of transfer and changes during the lactation period. *Mar Ecol Prog Ser* 247, 249-256.
- Debier, C., Pomeroy, P.P., Dupont, C., Joiris, C., Comblin, V., Le Boulenge, E., Larondelle, Y., Thome, J.P., 2003b. Quantitative dynamics of PCB transfer from mother to pup during lactation in UK grey seals *Halichoerus grypus*. *Mar Ecol Prog Ser* 247, 237-248.
- Deem, S.L., Norton, T.M., Mitchell, M., Segars, A., Alleman, A.R., Cray, C., Poppenga, R.H., Dodd, M., Karesh, W.B., 2009. Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *J Wildl Dis* 45, 41-56.
- Delgado, C., Valente, A., Quaresma, I., Costa, M., Dellinger, T., 2011. Blood biochemistry reference values for wild juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from Madeira archipelago. *J Wildl Dis* 47, 523-529.
- Denison, M.S., Nagy, S.R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 309-334.
- Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P., Bonati, L., 2002. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* 141, 3-24.
- Desvages, G., Girondot, M., Pieau, C., 1993. Sensitive Stages for the Effects of Temperature on Gonadal Aromatase-Activity in Embryos of the Marine Turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen Comp Endocrinol* 92, 54-61.
- Di Giulio, R.T., Hinton, D.E., 2008. Introducción. In: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The toxicology of fishes*. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA, pp. 3-9.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30, 293-342.
- Dickinson, V.M., Jarchow, J.L., Trueblood, M.H., 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *J Wildl Dis* 38, 143-153.
- Dickson, L.C., Buzik, S.C., 1993. Health risks of "dioxins": a review of environmental and toxicological considerations. *Vet Hum Toxicol* 35, 68-77.
- Dietz, R., Heide-Jorgenson, M.-P., Härkönen, T., 1989. Mass death of harbour seals *Phoca vitulina* in Europe. *Ambio* 18, 258-264.
- Divers, S.J., 2000. Reptilian liver and gastrointestinal testing. In: Fudge, A.M. (Ed.), *Laboratory Medicine (Avian and Exotic Pets)*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Dood, J.C.K., 1988. Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758). United States Fish and Wildlife Service. U. S. Department of the Interior. *FAO Synopsis NMFS-149. Biological Report 88 (14)* Washington, D.C.
- Dunier, M., Siwicki, A.K., 1993. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. *Fish Shellfish Immunol* 3, 23-438.
- Eder, E., Ceballos, A., Martins, S., Pérez-García, H., Marín, I., Marco, A., Cardona, L., 2012. Foraging dichotomy in loggerhead sea turtles *Caretta caretta* off northwestern Africa. *Mar Ecol Prog Ser* 470, 113-122.



- Ehrhart, L.M., Bagley, D.A., Redfoot, W.E., 2003. Loggerhead turtles in the Atlantic Ocean: Geographic distribution, abundance, and population status. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 157-174.
- Eisenreich, K.M., Kelly, S.M., Rowe, C.L., 2009. Latent mortality of juvenile snapping turtles from the Upper Hudson River, New York, exposed maternally and via the diet to polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environ Sci Technol* 43, 6052-6057.
- Eisler, R., 2000. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Encalada, S.E., Bjørndal, K.A., Bolten, A.B., Zurita, J.C., Schroeder, B., Possardt, S., Sears, C.J., Bowen, B.W., 1998. Population structure of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nesting colonies in the Atlantic and Mediterranean as inferred from mitochondrial DNA control region sequences. *Mar Biol* 130, 567-575.
- Epperly, S., 2003. Fisheries-related mortality and turtle excluder devices (TEDs). In: Lutz, P.L., Musick, J.A., Wyneken, J. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles II*. CRC Marine Science Series, Florida, USA, pp. 339-353.
- Ertl, R.P., Winston, G.W., 1998. The microsomal mixed function oxidase system of amphibians and reptiles: components, activities and induction. *Comp Biochem Physiol* 121, 85-105.
- Feeley, M.M., 1995. Biomarkers for Great Lakes priority contaminants: halogenated aromatic hydrocarbons. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 9, 7-16.
- Felsot, A.S., Racke, K.D., Hamilton, D.J., 2003. Disposal and degradation of pesticide waste. *Rev Environ Contam Toxicol* 177, 123-200.
- Fernández, P., Vilanova, R.M., Martínez, C., Appleby, J., Grimalt, J.O., 2000. The historical record of atmospheric pyrolytic pollution over Europe registered in the sedimentary PAH from remote mountain lakes. *Environ Sci Technol* 34, 1906-1913.
- Fernie, K.J., Smits, J.E., Bortolotti, G.R., Bird, D.M., 2001. In ovo exposure to polychlorinated biphenyls: reproductive effects on second-generation American kestrels. *Arch Environ Contam Toxicol* 40, 544-550.
- Ferri, V., 1999. Introducción. In: Grijalbo (Ed.), *Tortugas y galápagos*. Editorial Grijalbo, España, pp. 8-28.
- Finkelstein, M.E., Grisman, K.A., Croll, D.A., Tershy, B.R., Keitt, B.S., Jarman, W.M., Smith, D.R., 2007. Contaminant-associated alteration of immune function in black-footed albatross (*Phoebastria nigripes*), a North Pacific predator. *Environ Toxicol Chem* 26, 1896-1903.
- Fitzgerald, D.J., Robinson, N.I., Pester, B.A., 2004. Application of benzo [a] pyrene and coal tar tumor dose-response data to a modified benchmark dose method of guideline development. *Environ Health Perspect* 112, 1341-1346.
- Flint, M., Morton, J.M., Limpus, C.J., Patterson-Kane, J.C., Mills, P.C., 2010. Reference intervals for plasma biochemical and hematologic measures in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from Moreton Bay, Australia. *J Wildl Dis* 46, 731-741.
- Focardi, S., Leonzio, C., Fossi, C., 1988. Variations in polychlorinated biphenyl congener composition in eggs of Mediterranean water birds in relation to their position in the food chain. *Environ Pollut* 52, 243-255.
- Fontenot, D.K., Lamberski, N., Pfaff, S., 2004. Physical, Hematologic, and Plasma Biochemistry Values of Five Crocodile Monitors, *Varanus salvadorii*. *J Herpet Med Surgery* 14, 5-9.
- Fossi, C., Leonzio, C., Focardi, S., Renzoni, A., 1988. The black-headed gull's adaptation to polluted environments: the role of the mixed-function oxidase detoxification system. *Environ Conserv Biol* 15, 221-224.
- Fox, G.A., 2001a. Effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife in Canada: past, present, and future. *Water Qual Res J Can* 36, 233-251.
- Fox, G.A., 2001b. Wildlife as sentinels of human health effects in the Great Lakes-St. Lawrence basin. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 6, 853-861.
- Franzellitti, S., Locatelli, C., Gerosa, G., Vallini, C., Fabbri, E., 2004. Heavy metals in tissues of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the northwestern Adriatic Sea. *Comp Biochem Physiol* 138, 187-194.
- Fraser, A.J., Burkow, I.C., Wolkers, H., Mackay, D., 2002. Modeling biomagnification and metabolism of contaminants in harp seals of the Barents Sea. *Environ Toxicol Chem* 21, 55-61.

- Frías-Espéricueta, M.G., Osuna-López, J.I., Ruíz-Telles, A., Quintero-Álvarez, J.M., López-López, G., Izaguirre-Fierro, G., Voltolina, D., 2006. Heavy metals in the tissues of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* from a nesting site of the northwest coast of Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 77, 179-185.
- Fukushima, M., Kawai, S., 1981. Variation of organochlorine residue concentration and burden in striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, with growth. In: Fujiyama, T. (Ed.), *Studies on the levels of organochlorine compounds and heavy metals in the marine organisms*, University of the Ryukyus, Okinawa, pp. 97-114.
- Gallien, I., Caurant, F., Bordes, M., Bustamante, P., Miramand, P., Fernandez, B., Quellard, N., Babin, P., 2001. Cadmium-containing granules in kidney tissue of the Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) off the Faroe Islands. *Comp Biochem Physiol* 130, 389-395.
- Gamache, N., Horrocks, J., 1992. Fibropapilloma disease in green turtles, *Chelonia mydas* around Barbados, West Indies. In: Salmon, M., Wyneken, J. (Eds.), *Proc. 11th Ann. Workshop on Sea Turtle Biology & Conservation* 26 February-2 March 1991, Jekyll Island, Georgia. National Oceanic & Atmospheric Administration/National Marine Fisheries Service, January 1992. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-302.
- García-Fernández, A.J., Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., Hernández-García, A., María-Mojica, P., Romero, D., Jiménez, P., Castillo, J.J., Bellido, J.J., 2009. Heavy metals in tissues from loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the southwestern Mediterranean (Spain). *Ecotoxicology Environ Saf* 72, 557-563.
- Gardner, S.C., 2006b. Introduction to reptilian toxicology. In: Gardner, S.C., Oberdörster, E. (Eds.), *Toxicology of reptiles*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Gardner, S.C., Fitzgerald, S.L., Vargas, B.A., Rodríguez, L.M., 2006. Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California peninsula, Mexico. *Biometals* 19, 91-99.
- Gardner, S.C., Pier, M.D., Wesselman, R., Juarez, J.A., 2003. Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. *Mar Pollut Bull* 46, 1082-1089.
- Gelli, D., Ferrari, V., Zanella, A., Arena, P., Pozzi, L., Nannarelli, S., Vaccaro, C., Bernardini, D., Romagnoli, S., 2009. Establishing physiological blood parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Eur J Wildl Res* 55, 59-63.
- Gendron, A.D., Bishop, C.A., Van Der Kraak, G., Fortin, R., Hontela, A., 1994. *Proceedings of Society of Environmental Toxicology and Chemistry 15th Annual Meeting*. Denver, Colorado, USA, p. 162.
- George, R.H., 1997. Health problems and diseases of sea turtles. In: Lutz, P., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 363-385.
- Geraci, J.R., 1990. Physiologic and toxic effects on cetaceans. In: Geraci, J.R., Aubin, D.J. (Eds.), *Sea Mammals and Oil: Confronting the Risks*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 167-192.
- Gertszenberger, S.L., Heimler, I., Smies, R., Hutz, R.J., Dasmahapatra, A.K., Tripoli, V., Dellinger, J.A., 2000. Minimal endocrine alterations in rodents after consumption of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Arch Environ Contamin Toxicol* 38, 371-376.
- Geyer, H.J., Scheunert, I., Bruggemann, R., Matthies, M., Steinberg, C.E., Zitko, V., Kettrup, A., Garrison, W., 1994. The relevance of aquatic organisms' lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals: toxicity of lindane to different fish species. *Ecotoxicology Environ Saf* 28, 53-70.
- Gibson, J., Smith, G., 1999. Reducing threats to foraging habitats. In: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A., Donnelly, M. (Eds.), *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication, pp. 184-188.
- Gilbertson, M., Kubiak, T., Ludwig, J., Fox, G., 1991. Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *J Toxicol Environ Health* 33, 455-520.
- Godley, B.J., Broderick, A.C., Mrosovsky, N., 2001. Estimating hatchling sex ratios of loggerhead turtles in Cyprus from incubation durations. *Mar Ecol Prog Ser* 210, 195-201.
- Godley, B.J., Gaywood, M.J., Law, R.J., McCarthy, C.J., McKenzie, C., Patterson, I.A.P., Penrose, R.S., Reid, R.J., Ross, H.M., 1998a. Patterns of marine turtle mortality in British waters (1992-1996) with reference to tissue contaminants levels. *J Mar Biol Ass UK* 78, 973-984.
- Godley, B.J., Thompson, D.R., Furness, R.W., 1999. Do heavy metal concentrations pose a threat to marine turtles from the Mediterranean Sea? *Mar Poll Bull* 38, 497-502.

- Godley, B.J., Thompson, D.R., Waldron, S., Furness, R.W., 1998b. The trophic status of marine turtles as determined by stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 166, 277–284.
- Gordon, A.N., Pople, A.R., Ng, J., 1998. Trace metal concentrations in livers and kidneys of sea turtles from south-eastern Queensland, Australia. *Mar Freshwater Res* 1998, 409–414.
- Gottdenker, N.L., Jacobson, E.R., 1995. Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *Am J Vet Res* 56, 19-21.
- Goyer, R.A., 1984. Metal-protein complexes in detoxification process. In: Brown, S.S. (Ed.), *Clinical Chemistry and Clinical Toxicology*, 2. Academic Press, London, pp. 199-209.
- Goyer, R.A., 1996. Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*. 5th Edition. McGraw-Hill, New York, pp. 691-736.
- Grant, A., Middleton, R., 1990. An assessment of metal contamination in the Humbert Estuary, U. K. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 31, 71-85.
- Grasman, K.A., Fox, G.A., 2001. Associations between altered immune function and organochlorine contamination in young Caspian terns (*Sterna caspia*) from Lake Huron, 1997-1999. *Ecotoxicology* 10, 101-114.
- Grasman, K.A., Fox, G.A., Scanlon, P.F., Ludwig, J.P., 1996. Organochlorine-associated immunosuppression in pre-fledgling Caspian terns and herring gulls from the Great Lakes: an ecoepidemiological study. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 829-842.
- Grasman, K.A., Scanlon, P.F., Fox, G.A., 1998. Reproductive and physiological effects of environmental contaminants in fish-eating birds of the Great Lakes: a review of historical trends. *Environ Monitor Assess* 53, 117-145.
- Gray, J.S., 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar Pollut Bull* 45, 46-52.
- Greig, D.J., Ylitalo, G.M., Hall, A.J., Fauquier, D.A., Gulland, F., 2007. Transplacental transfer of organochlorines in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Environ Toxicol Chem* 26, 37-44.
- Guillette, L.J., 2000. Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. Growth hormone and IGF Res Supplement B, 45-50.
- Guillette, L.J., Jr., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102, 680-688.
- Guillette, L.J., Jr., Pickford, D.B., Crain, D.A., Rooney, A.A., Percival, H.F., 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen Comp Endocrinol* 101, 32-42.
- Guimaraes, R.M., Asmus, C.I., Meyer, A., 2007. DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health. *Cad Saude Publica* 23, 2835-2844.
- Guirlet, E., Das, K., Girondot, M., 2008. Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquat Toxicol* 88, 267-276.
- Guirlet, E., Das, K., Thome, J.P., Girondot, M., 2010. Maternal transfer of chlorinated contaminants in the leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, nesting in French Guiana. *Chemosphere* 79, 720-726.
- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141, 131-160.
- Hall, R.J., Belisle, A.A., Sileo, L., 1983. Residues of petroleum hydrocarbons in tissues of sea turtles exposed to the Ixtoc I oil spill. *J Wildl Dis* 19, 106-109.
- Hamann, M., Godfrey, M.H., Seminoff, J.A., Arthur, K., Barata, P.C.R., Bjørndal, K.A., Bolten, A.B., Broderick, A.C., Campbell, L.M., Carreras, C., et al., 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endang Species Res* 11, 245-269.
- Hamann, M., Limpus, C.J., Owens, D.W., 2003. Reproductive cycles of males and females. In: Lutz, P.L., Musick, J.A., Wyneken, J. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles II*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 135-162.
- Hamann, M., Limpus, C.J., Whittier, J.M., 2002. Patterns of lipid storage and mobilisation in the female green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Comp Biochem Physiol* 172, 485-493.

- Hanley, C.S., Hernandez-Divers, S.J., Bush, S., Latimer, K.S., 2004. Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). *J Zoo Wildl Med* 35, 328-332.
- Hanson, J., Wibbels, T., Martin, R.E., 1998. Predicted female bias in hatchling sex ratios of loggerhead sea turtles from a Florida nesting beach. *Can J Zool – Rev Can Zool* 76, 1850-1861.
- Harr, K.E., Alleman, A.R., Dennis, P.M., Maxwell, L.K., Lock, B.A., Bennett, R.A., Jacobson, E.R., 2001. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas. *J Am Vet Med Assoc* 218, 915-921.
- Hatase, H., Takai, N., Matsuzawa, Y., Sakamoto, W., Omuta, K., Goto, K., Arai, N., Fujiwara, T., 2002. Size-related differences in feeding habitat use of adult female loggerhead turtles *Caretta caretta* around Japan determined by stable isotope analyses and satellite telemetry. *Mar Ecol Prog Ser* 233, 273-281.
- Hawkes, L.A., Broderick, A.C., Coyne, M.S., Godfrey, M.H., López-Jurado, L.F., López-Suárez, P., Merino, S.E., Varo-Cruz, N., Godley, B.J., 2006. Phenotypically linked dichotomy in sea turtle foraging requires multiple conservation approaches. *Curr Biol* 16, 990-995.
- Hawkey, C.M., Dennet, T.B., 1989. Atlas de hematología veterinaria comparada. Grass Ediciones, SA, Barcelona.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A., 2002a. Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419, 895-896.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A., 2002b. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5476-5480.
- Haylamicheal, I.D., Dalvie, M.A., 2009. Disposal of obsolete pesticides, the case of Ethiopia. *Environ Int* 35, 667-673.
- Haynes, D., Johnson, J.E., 2000. Organochlorine heavy metal and polyaromatic hydrocarbon pollutant concentrations in the Great Barrier Reef (Australia): a review. *Mar Pollut Bull* 41, 267-278.
- Hays, G.C., Fossette, S., Katselidis, K.A., Schofield, G., Gravenor, M.B., 2010. Breeding periodicity for male sea turtles, operational sex ratios, and implications in the face of climate change. *Conserv Biol* 24, 1636-1643.
- Headrick, M.L., Hollinger, K., Lovell, R.A., Matheson, J.C., 1999. PBBs, PCBs, and dioxins in food animals, their public health implications. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 15, 109-131, ix-x.
- Heard, D., Harr, K., Wellehan, J., 2004. Diagnostic sampling and laboratory tests. In: Girling, S.J., Raiti, P. (Eds.), *Manual of Reptiles*. 2nd ed. British Small Animal Veterinary Association, Quedgeley, England, pp. 71-86.
- Hebert, C.E., Glooschenko, G.E., Haffner, G.D., Lazar, R., 1993. Organic contaminants in snapping turtle (*Chelydra serpentina*) populations from southern Ontario, Canada. *Arch Environ Contamin Toxicol* 24, 35-43.
- Hebert, C.E., Weseloh, D.V., 2006. Adjusting for temporal change in trophic position results in reduced rates of contaminant decline. *Environ Sci Technol* 40, 5624-5628.
- Hecker, M., Murphy, M.B., Giesy, J.P., Hopkins, W.A., 2006. Induction of cytochrome P4501A in African brown house snake (*Lamprophis fuliginosus*) primary hepatocytes. *Environ Toxicol Chem* 25, 496-502.
- Henríquez-Hernández, L.A., Luzardo, P.L., Almeida-González, M., Álvarez-León, E.E., Serra-Majem, L., Zumbado, M., Boada, L.D., 2011. Background levels of polychlorinated biphenyls in the population of the Canary Islands (Spain). *Environ Res* 111, 10-16.
- Herbst, L.H., Jacobson, E., Moretti, R., Brown, T., Sundberg, J.P., Klein, P.A., 1995. Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Dis Aquat Organ* 22, 1-12.
- Herbst, L.H., Moretti, R., Brown, T., Klein, P.A., 1996. Sensitivity of the transmissible green turtle fibropapillomatosis agent to chloroform and ultracentrifugation conditions. *Dis Aquat Organ* 25, 225-228.
- Hickey, J.J., Anderson, D.W., 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science* 162, 271-273.
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., Pérez-Santigosa, N., Laza, A., Camacho, I., Recio, F., 2007. Hematologic and biochemical reference intervals of free-living Mediterranean pond turtles (*Mauremys leprosa*). *J Wildl Dis* 43, 798-801.

- Hodson, P.V., 1988. The effect of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish. *Aquat Toxicol* 11, 3-18.
- Hoekstra, P.F., O'Hara, T.M., Backus, S.M., Hanns, C., Muir, D.C., 2005. Concentrations of persistent organochlorine contaminants in bowhead whale tissues and other biota from northern Alaska: implications for human exposure from a subsistence diet. *Environ Res* 98, 329-340.
- Holliday, D.K., Elskus, A.A., Roosenburg, W.M., 2009. Impacts of multiple stressors on growth and metabolic rate of *Malaclemys terrapin*. *Environ Toxicol Chem* 28, 338-345.
- Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L., Gray, L.E., 2008. Fifteen years after "Wingspread"—environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol Sci* 105, 235-259.
- Humphrey, H.E.B., 1988. Chemical contaminants in the Great Lakes: the human health aspect. In: Evans, M.S. (Ed.), *Toxics contaminants and ecosystem health: a Great Lakes focus*, Wiley, New York, pp. 153-156.
- Hutchinson, J., Simmonds, M., 1992. Escalation of threats to marine turtles. *Oryx* 26, 95-102.
- Hutchinson, L., Simmonds, M., 1991. A review of the effects of pollution on marine turtles. A Greenpeace Ecotoxicology Project London. Greenpeace International.
- Huwe, J.K., 2002. Dioxins in food: a modern agricultural perspective. *J Agric Food Chem* 50, 1739-1750.
- Ikonomopoulou, M.P., Olszowy, H., Hodge, M., Bradley, A.J., 2009. The effect of organochlorines and heavy metals on sex steroid-binding proteins in vitro in the plasma of nesting green turtles, *Chelonia mydas*. *Comp Biochem Physiol* 179, 653-662.
- Ikonomopoulou, M.P., Olszowy, H., Limpus, C., Francis, R., Whittier, J., 2011. Trace element concentrations in nesting flatback turtles (*Natator depressus*) from Curtis Island, Queensland, Australia. *Mar Environ Res* 71, 10-16.
- Innis, C., Tlusty, M., Perkins, C., Holladay, S., Merigo, C., Weber, E.S., 2008. Trace metal and organochlorine pesticide concentrations in cold-stunned juvenile kemp's ridley turtles (*Lepidochelys kempii*) from Cape Cod, Massachusetts. *Chelonian Conserv Biol* 7, 230-239.
- Innis, C.J., Tlusty, M., Merigo, C., Weber, E.S., 2007. Metabolic and respiratory status of cold-stunned Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*). *Comp Biochem Physiol* 177, 623-630.
- Inoue, N., Makita, Y., 1996. Neurological aspects in human exposure to manganese. In: Chang, L.W. (Ed.), *Toxicology of Metals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 415-422.
- IUCN, 2007. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). IUCN Red List of Threatened Species. IUCN SSC. UK Office, Cambridge, UK.
- Jacobson, E., 1992. Laboratory investigations. In: Beynon, P.H. (Ed.), *Manual of reptiles*. British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, pp. 50-53.
- Jacobson, E.R., 2007. Infectious diseases and pathology of reptiles. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Jaeger, R.J., Conolly, R.B., Reynolds, E.S., Murphy, S.D., 1975. Biochemical toxicology of unsaturated halogenated monomers. *Environ Health Perspect* 11, 121-128.
- Jaga, K., Brosius, D., 1999. Pesticide exposure: human cancers on the horizon. *Rev Environ Health* 14, 39-50.
- Jakszyn, P., Goni, F., Etxeandia, A., Vives, A., Millan, E., López, R., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Chirlaque, M.D., et al., 2009. Serum levels of organochlorine pesticides in healthy adults from five regions of Spain. *Chemosphere* 76, 1518-1524.
- James, M.C., Ottensmeyer, C.A., Myers, R.A., 2005. Identification of high-use habitat and threats to leatherback sea turtles in northern waters: new directions for conservation. *Ecol Lett* 8, 195-201.
- Janik, F., Wolf, H.U., 1992. The Ca(2+)-transport-ATPase of human erythrocytes as an in vitro toxicity test system—acute effects of some chlorinated compounds. *J Appl Toxicol* 12, 351-358.
- Jerez, S., Motas, M., Cánovas, R.A., Talavera, J., Almela, R.M., Del Río, A.B., 2010. Accumulation and tissue distribution of heavy metals and essential elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Spanish Mediterranean coastline of Murcia. *Chemosphere* 78, 256-264.

- Johnson, L.L., Arkoosh, M.R., Bravo, C.F., Collier, T.K., Krahn, M.M., Meador, J.P., Myers, M.S., Reichert, W.L., Stein, J.E., 2008. The Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish from Puget Sound, Washington. In: di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CPR Press, Boca Raton, New York, USA.
- Joyner, P.H., Shreve, A.A., Spahr, J., Fountain, A.L., Sleeman, J.M., 2006. Phaeohyphomycosis in a free-living eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). *J Wildl Dis* 42, 883-888.
- Julshamn, K., Andersen, A., Ringdal, O., Morkore, J., 1987. Trace elements intake in the Faroe Islands. I. Element levels in edible parts of pilot whales (*Globicephalus meleanus*). *Sci Total Environ* 65, 53-62.
- Kakizoe, Y., Sakaoka, K., Kakizoe, F., Yoshii, M., Nakamura, H., Kanou, Y., Uchida, I., 2007. Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *J Zoo Wildl Med* 38, 77-84.
- Kamezaki, N., Matsuzawa, Y., Abe, O., Asakawa, H., Fuji, T., Goto, K., Hagino, S., Hayami, H., Ishii, M., Iwamoto, T., et al., 2003. Loggerhead turtle nesting in Japan. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 210-217.
- Kampalath, R., Gardner, S.C., Méndez-Rodríguez, L., Jay, J.A., 2006. Total and methylmercury in three species of sea turtles of Baja California Sur. *Mar Poll Bull* 52, 1784-1832.
- Kannan, K., Perrotta, E., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in livers of California sea otters. *Chemosphere* 71, 649-655.
- Kannan, K., Tanabe, S., Borrell, A., Aguilar, A., Focardi, S., Tatsukawa, R., 1993. Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in striped dolphins affected by an epizootic in the western Mediterranean sea. *Arch Environ Contamin Toxicol* 25, 227-233.
- Kashiwagi, K., Utsumi, K., Kashiwagi, K., Ohta, S., Sugihara, K., Hanada, H., Kitamura, S., 2008. Effects of endocrine disrupting chemicals on amphibian metamorphosis and mitochondrial membrane permeability transition. *J Health Sci* 54, 273-280.
- Kaska, Y., Downie, J.R., Tippet, R., Furness, R.W., 1998. Natural temperature regimes for loggerhead and green turtle nests in the eastern Mediterranean. *Can J Zool* 76, 723-729.
- Keller, J.M., Kucklick, J.R., Harms, C.A., McClellan-Green, P.D., 2004a. Organochlorine contaminants in sea turtles: correlations between whole blood and fat. *Environ Toxicol Chem* 23, 726-738.
- Keller, J.M., Kucklick, J.R., McClellan-Green, P.D., 2004b. Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. *Arch Environ Contamin Toxicol* 46, 254-264.
- Keller, J.M., Kucklick, J.R., Stamper, M.A., Harms, C.A., McClellan-Green, P.D., 2004c. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environ Health Perspect* 112, 1074-1079.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P., 2004. Effects of organochlorine compounds on cytochrome P450 aromatase activity in an immortal sea turtle cell line. *Mar Environ Res* 58, 347-351.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P.D., Kucklick, J.R., Keil, D.E., Peden-Adams, M.M., 2006. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. *Environ Health Perspect* 114, 70-76.
- Keller, J.M., McClellan-Green, P.D., Lee, A.M., Arendt, M.D., Maier, P.P., Segars, A.L., Whitaker, J.D., Keil, D.E., Peden-Adams, M.M., 2005. Mitogen-induced lymphocyte proliferation in loggerhead sea turtles: comparison of methods and effects of gender, plasma testosterone concentration, and body condition on immunity. *Vet Immun Immunop* 103, 269-281.
- Keller, J.M., Meyer, J.N., Mattie, M., Augsperger, T., Rau, M., Dong J, Levin, E.D., 2000. Assessment of immunotoxicology in wild populations: review and recommendations. *Rev Toxicol* 3, 167-212.
- Keller, J.M., Thorvalson, K., Sheridan, T., Harms, C.A., Segars, A.L., Beasley, J., Day, R., Peden-Adams, M., Kucklick, J.R., Norton, T., 2007. Organic contaminant concentrations change in debilitated loggerhead turtle plasma during recovery in rehabilitation. In: Rees, A.F., Frick, M., Panagopoulou, A., Williams, K. (Eds.), *Proceedings of the Twenty-Seventh Annual Symposium on sea turtles biology and conservation*, South Carolina, USA, p. 20.
- Kendall, R.J., 2008. *Wildlife Toxicology: Integration of Ecological and Toxicological Research Strategies*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry 29th Annual Meeting, Tampa, Florida, USA, pp. 16-20.

- Kendall, R.J., 2010. Introduction and Overview. In: Kendall, R.J., Lacher, T.E., Cobb, G.P., Cox, S.B. (Eds.), *Wildlife toxicology: emerging contaminant and biodiversity issues*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA, pp. 1-14.
- Kennedy, C.J., Farrel, A.P., 2005. Ion homeostasis and internal stress response in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *J Exp Mar Biol Ecol* 323, 43-56.
- Kenyon, L.O., Landry, A.M., Gill, G.A., 2001. Trace metal concentrations in blood of the kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*). *Chelonian Conserv Biol* 4, 128-135.
- Kitana, N., Callard, I.P., 2008. Effect of cadmium on gonadal development in freshwater turtle (*Trachemys scripta*, *Chrysemys picta*) embryos. *J Environ Sci Health* 43, 262-271.
- Kleinow, K., Baker, J., Nichols, J., Gobas, F., Parkerton, T., Muir, D., Monteverdi, G., Mastrodome, P., 1999. Exposure, uptake, and disposition of chemicals in reproductive and developmental stages of selected oviparous vertebrates. In: Di Giulio, R.T., Tillit, D.E. (Eds.), *Reproductive and developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates*. SETAC Press, Pensacola, Florida, USA, pp. 9-111.
- Knotková, Z., Doubek, J., Knotek, Z., Hájková, P., 2002. Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises. *Acta Vet Brno* 71, 191-198.
- Knotkova, Z., Mazanek, S., Hovorka, M., Sloboda, M., Knotek, Z., 2005. Haematology and plasma chemistry of Bornean River turtles suffering from shell necrosis and haemogregarine parasites. *Case Report* 50, 421-426.
- Komoroske, L.M., Lewison, R.L., Seminoff, J.A., Deheyn, D.D., Dutton, P.H., 2011. Pollutants and the health of green sea turtles resident to an urbanized estuary in San Diego, CA. *Chemosphere* 84, 544-552.
- Komoroske, L.M., Lewison, R.L., Seminoff, J.A., Deustchman, D.D., Deheyn, D.D., 2012. Trace metals in an urbanized estuarine sea turtle food web in San Diego Bay, CA. *Sci Total Environ* 417-418, 108-116.
- Krahn, M.M., Hanson, M.B., Schorr, G.S., Emmons, C.K., Burrows, D.G., Bolton, J.L., Baird, R.W., Ylitalo, G.M., 2009. Effects of age, sex and reproductive status on persistent organic pollutant concentrations in "Southern Resident" killer whales. *Mar Pollut Bull* 58, 1522-1529.
- Krantz, W.C., Mulhern, B.M., Bagley, G.E., Sprunt, A., Ligas, F.J., Robertson, W.B., Jr., 1970. Organochlorine and heavy metal residues in bald eagle eggs. *Pestic Monit J* 4, 136-140.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kwan, D., 1994. Fat reserves and reproduction in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Wildlife Res* 21, 257-266.
- Labrada-Martagón, V., Rodríguez, P.A., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T., 2011. Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comp Biochem Physiol* 154, 65-75.
- Lafferty, K.D., Porter, J.W., Ford, S.E., 2004. Are diseases increasing in the ocean? *Annu Rev Ecol Syst* 35, 31-54.
- Lahaye, V., Bustamante, P., Dabin, W., Van Canneyt, O., Dhermain, F., Cesarini, C., Pierce, G.J., Caurant, F., 2006. New insights from age determination on toxic element accumulation in striped and bottlenose dolphins from Atlantic and Mediterranean waters. *Mar Pollut Bull* 52, 1219-1230.
- Lahvis, G.P., Wells, R.S., Kuehl, D.W., Stewart, J.L., Rhinehart, H.L., Via, C.S., 1995. Decreased lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4, 67-72.
- Lake, J.L., Haebler, R., Mckinney, R., Lake, C.A., Sadove, S.S., 1994. PCBs and other chlorinated organic contaminants in tissue of juvenile kemp's ridley turtles (*Lepidochelys kempii*). *Mar Environ Res* 38, 313-327.
- Lam, J.C., Tanabe, S., Chan, S.K., Lam, M.H., Martin, M., Lam, P.K., 2006. Levels of trace elements in green turtle eggs collected from Hong Kong: evidence of risks due to selenium and nickel. *Environ Pollut* 144, 790-801.
- Laurent, L., Casale, P., Bradai, M.N., Godley, B.J., Gerosa, G., Broderick, A.C., Schroth, W., Schierwater, B., Levy, A.M., Freggi, D., et al., 1998. Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean. *Molec Ecol* 7, 1529-1542.
- Law, R.J., Klungsoyr, J., 2000. The analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine samples. *Internat J Environ Poll* 13, 262-283.

- Lazar, B., Gracan, R., 2011. Ingestion of marine debris by loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in the Adriatic Sea. *Mar Pollut Bull* 62, 43-47.
- Lazar, B., Maslov, L., Romanic, S.H., Gracan, R., Krauthacker, B., Holcer, D., Tvrtkovic, N., 2011. Accumulation of organochlorine contaminants in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the eastern Adriatic Sea. *Chemosphere* 82, 121-129.
- Lee, J.S., Tanabe, S., Umino, H., Tatsukawa, R., Loughlin, T.R., Calkins, D.C., 1996. Persistent organochlorines in Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) from the bulk of Alaska and the Bering Sea 1976-1981. *Mar Pollut Bull* 32, 535-544.
- Leighton, F.A., 1993. The toxicity of petroleum oils to birds. *Environ Rev* 1, 92-103.
- Leonards, P.E., van Hattum, B., Leslie, H., 2008. Assessing the risks of persistent organic pollutants to top predators: a review of approaches. *Integr Environ Assess Manag* 4, 386-398.
- Leung, H.W., Kerger, B.D., Paustenbach, D.J., 2006. Elimination half-lives of selected polychlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans in breast-fed human infants. *J Toxicol Environ Health. Part A* 69, 437-443.
- Ley-Quinonez, C., Zavala-Norzagaray, A.A., Espinosa-Carreón, T.L., Peckham, H., Marquez-Herrera, C., Campos-Villegas, L., Aguirre, A.A., 2011. Baseline heavy metals and metalloid values in blood of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Baja California Sur, Mexico. *Mar Pollut Bull* 62, 1979-1983.
- Limpus, C.J., Chaloupka, M., 1997. Nonparametric regression modelling of green sea turtle growth rates. *Mar Ecol Prog Ser* 149, 23-24.
- Limpus, C.J., Limpus, D.J., 2003. Loggerhead turtles in the Equatorial and Southern Pacific Ocean: a species in decline. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 199-209.
- Lind, P.M., Milnes, M.R., Lundberg, R., Bermudez, D., Orberg, J.A., Guillette, L.J., 2004. Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environ Health Perspect* 112, 359-362.
- Lockyer, C., Brown, S.G., 1981. The migration of whales. In: Aidley, D.J. (Ed.), *Society for experimental biology seminar series (13). Animal migration*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 105-137.
- López-Jurado, L.F., Cabrera, I., Cejudo, D., Évora, C., Alfama, P., 2000a. Distribution of marine turtles in the Archipelago of Cabo Verde, Western Africa. *Proceedings of the 19th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, 245-247.
- López-Olvera, J.R., Montane, J., Marco, I., Martínez-Silvestre, A., Soler, J., Lavin, S., 2003. Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *J Wildl Dis* 39, 830-836.
- López Jurado, L.F., Évora, C., Cabrera, I., Cejudo, D., Alfama, P., 2000b. Proposal for the conservation of marine turtles on the island of Boavista (Republic of Cabo Verde, western Africa). *Proceedings of the 19th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, 204-206.
- López Jurado, L.F., Sanz, P., Abella, E., 2007. Loggerhead nesting on Boa Vista, República de Cabo Verde. In: *SWOT Reports-State of the World's Sea Turtles* 2.
- Lutcavage, E.M., Musick, J.A., 1985. Aspects of the biology of sea turtles in Virginia. *Copeia*, 449-456.
- Lutcavage, E.M., Pample, P., Witherington, Lutz, P.L., 1997a. *Human Impacts on Sea Turtles Survival, The Biology of Sea Turtles*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 387-408.
- Lutcavage, M.E., Lutz, P.L., Bossart, G.D., Hudson, D.M., 1997b. Physiologic and clinicopathologic effects of crude oil on loggerhead sea turtles. *Arch Environ Contamin Toxicol* 28, 417-422.
- Lutz, P., Dunbar-Cooper, A., 1987. Variations in the blood chemistry of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Fishery Bull* 85, 37-43.
- Lutz, P., Lutcavage, M., Hudson, D., 1986. Study of the Effect of Oil on Marine Turtles. In: Vargo, S., Lutz, P.L., Odell, D.K., Van Vleet, T., Bossart, G. (Eds.). *Final Report. Physiological effects, Minerals Management Service Contract Number 114-12-0001-30063 Florida Inst. of Oceanography, St. Petersburg, Florida, USA*.
- Lutz, P.L., 1975. Adaptive and evolutionary aspects of the ionic content of fishes. *Copeia*, 369-373.



Luzardo, O.P., Goethals, M., Zumbado, M., Álvarez-León, E.E., Cabrera, F., Serra-Majem, L., Boada, L.D., 2006. Increasing serum levels of non-DDT-derivative organochlorine pesticides in the younger population of the Canary Islands (Spain). *Sci Total Environ* 367, 129-138.

Luzardo, O.P., Mahtani, V., Troyano, J.M., Álvarez de la Rosa, M., Padilla-Pérez, A.I., Zumbado, M., Almeida, M., Burillo-Putze, G., Boada, C., Boada, L.D., 2009. Determinants of organochlorine levels detectable in the amniotic fluid of women from Tenerife Island (Canary Islands, Spain). *Environ Res* 109, 607-613.

Lydersen, C., Wolkers, H., Severinsen, T., Kleivane, L., Nordoy, E.S., Skaare, J.U., 2002. Blood is a poor substrate for monitoring pollution burdens in phocid seals. *Sci Total Environ* 292, 193-203.

Maffucci, F., Caurant, F., Bustamante, P., Bentivegna, F., 2005. Trace element (Cd, Cu, Hg, Se, Zn) accumulation and tissue distribution in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the Western Mediterranean Sea (southern Italy). *Chemosphere* 58, 535-542.

Mandal, P.K., 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Comp Biochem Physiol* 175, 221-230.

Mansour, S.A., 2004. Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicology* 198, 91-115.

Marco, A., Abella, E., Liria Loza, A., Martins, S., López, O., Jiménez Bordón, S., Medina, M., Oujo, C., Gaona, P., Godley, B.J., López Jurado, L.F., 2012. Abundance and exploitation of loggerhead turtles nesting in Boa Vista island, Cape Verde: the only substantial rookery in the eastern Atlantic. *Ani Conserv* 15, 351-360.

Marco, A., Pérez, E.A., Monzón Argüello, C., Martins, S., Araujo, S., López Jurado, L.F., 2011. The international importance of the archipelago of Cape Verde for marine turtles, in particular the loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Zool Cabover* 2 1, 1-11.

Marcovaldi, M.A., Godfrey, M.H., Mrosovsky, N., 1997. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. *Can J Zool* 75, 755-770.

Margaritoulis, D., 2007. Status update of marine turtles in the Mediterranean. In: López-Jurado, L.F., Liria Loza, A. (Eds.), *Marine turtles. Recovery of extinct populations*, Monografía del Instituto Canario de Ciencias Marinas. Pérez-Galdós, S.L.U, Gran Canaria, pp. 77-94.

Margaritoulis, D., Argano, R., Baran, I., Bentivegna, F., Bradai, N.M., Camiñas, J.A., Casale, P., De Metrio, G., Demetropoulos, A., Gerosa, G., Godley, B.J., Haddoud, D.A., Joughton, J., Laurent, L., Lazar, B., 2003. Loggerhead turtles in the Mediterranean Sea: present knowledge and conservation perspective. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 175-198.

Mariussen, E., Fonnum, F., 2006. Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update. *Crit Rev Toxicol* 36, 253-289.

Marsili, L., Caruso, A., Fossi, M.C., Zanardelli, M., Politi, E., Focardi, S., 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. *Chemosphere* 44, 147-154.

Marth, E., Stunzner, D., Kock, M., Mose, J.R., 1989. Toxicokinetics of chlorinated hydrocarbons. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 33, 514-520.

Martineau, D., Beland, P., Desjardins, C., Legace, A., 1987. Levels of organochlorine chemicals in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. *Arch Environ Contamin Toxicol* 16, 137-147.

Martineau, D., Lemberger, K., Dallaire, A., Labelle, P., Lipscomb, T.P., Michel, P., Mikaelian, I., 2002. Cancer in wildlife, a case study: beluga from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. *Environ Health Perspect* 110, 285-292.

Matsumoto, E., Kawanaka, Y., Yun, S.J., Oyaizu, H., 2009. Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 84, 205-216.

Matthews, H.B., Surlis, J.R., Carver, J.G., Anderson, M.W., 1984. Halogenated biphenyl transport by blood components. *Soc Toxicology* 4, 420-428.

McArthur, S., 2004. Problem-solving approach to conditions of marine turtles. In: McArthur, S., Wilkinson, R., Meyer, J. (Eds.), *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 301-307.

McConnell, E.E., 1985. Comparative toxicity of PCBs and related compounds in various species of animals. *Environ Health Perspect* 60, 29-33.

- McFarland, V.A., Clarke, J.U., 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ Health Perspect* 81, 225-239.
- McGroddy, S.E., Farrington, J.W., 1995. Sediment porewater partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in three cores from Boston harbor, Massachusetts. *Environ Sci Technol* 29, 1542-1550.
- McKay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Env Poll* 110, 375-391.
- McKenzie, C., Godley, B.J., Furness, R.W., Wells, D.E., 1999. Concentrations and patterns of organochlorine contaminants in marine turtles from Mediterranean and Atlantic waters. *Mar Environ Res* 47, 117-135.
- McKenzie, C., Rogan, E., Reid, R.J., Wells, D.E., 1997. Concentrations and patterns of organic contaminants in Atlantic white-sided dolphins (*Lagenorhynchus acutus*) from Irish and Scottish coastal waters. *Environ Pollut* 98, 15-27.
- McKim, J.M., Jr., Johnson, K.L., 1983. Polychlorinated biphenyls and *p,p'*-DDE in Loggerhead and Green postyearling Atlantic sea turtles. *Bull Environ Contam Toxicol* 31, 53-60.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contamin Toxicol* 143, 79-165.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N., Marmolejo-Valencia, A., 1997. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen Comp Endocrinol* 107, 373-385.
- Metin, K., Türkozan, O., Kargin, F., Basumoglu, Y.K., Taskavak, E., Koca, S., 2006. Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive european pond turtle *Emys orbicularis*. *Acta Vet Brno* 75, 49-55.
- Meyers-Schone, L., Walton, B.T., 1994. Turtles as monitors of chemical contaminants in the environment. *Rev Environ Contamin Toxicol* 135, 93-153.
- Miao, X.S., Balazs, G.H., Murakawa, S.K., Li, Q.X., 2001. Congener-specific profile and toxicity assessment of PCBs in green turtles (*Chelonia mydas*) from the Hawaiian Islands. *Sci Total Environ* 281, 247-253.
- Milne, G.W.A., 1995. CRC handbook of pesticides. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Milnes, M.R., Allen, D., Bryan, T.A., Sedacca, C.D., Guillette, L.J., Jr., 2004. Developmental effects of embryonic exposure to toxaphene in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol* 138, 81-87.
- Milnes, M.R., Jr., Roberts, R.N., Guillette, L.J., Jr., 2002. Effects of incubation temperature and estrogen exposure on aromatase activity in the brain and gonads of embryonic alligators. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3, 393-396.
- Milton, S., Lutz, P., Shigenaka, G., 2003. Oil Toxicity and Impacts on Sea Turtles. In: Shigenaka, G. (Ed.), *Oil and Sea Turtles*. NOAA's National Ocean Service, U.S. Fish and Wildlife Service, pp. 35-45.
- Miller, J.D., 1985. Embryology of marine turtles., in: Gans, C., Billett, F., Maderson, P.F.A. (Eds.), *Biology of the Reptilia*. Academic Press, New York, pp. 269-328.
- Miller, J.D., Limpus, C.J., M.H., G., 2003. Nest site selection, oviposition, eggs, development, hatching, and emergence of loggerhead turtles. In: Bolten, A.B., Witherington, B.E. (Eds.), *Loggerhead sea turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, pp. 63-78.
- Mineau, P., 1982. Levels of major organochlorine contaminants in sequentially-laid herring gull eggs. *Chemosphere* 11, 679-685.
- Moccia, R.D., Fox, G.A., Britton, A., 1986. A quantitative assessment of thyroid histopathology of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Great Lakes and a hypothesis on the causal role of environmental contaminants. *J Wildl Dis* 22, 60-70.
- Monagas, P., Orós, J., Araña, J., González-Díaz, O.M., 2008. Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Mar Pollut Bull* 56, 1949-1952.
- Montilla, A.J., Hernández, J.L., Árraga, M.C., 2006. Valores hematológicos de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) presente en la Alta Guajira. *Revista Científica* 16, 219-226.

- Monzón-Argüello, C., Rico, C., Carreras, C., Calabuig, P., Marco, A., López-Jurado, L.F., 2009. Variation in spatial distribution of juvenile loggerhead turtles in the eastern Atlantic and western Mediterranean Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 373, 79-86.
- Monzón Argüello, C., Rico, C., Varo Cruz, N., López, P., Marco, A., López Jurado, L.F., 2010. Population structure and conservation implications for the loggerhead sea turtle of the Cape Verde Islands. *Conserv Genet* 11, 1871-1884.
- Moore, C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ Res* 108, 131-139.
- Moore, M.N., Livingstone, D.R., Widdows, J., 1989. Hydrocarbons in marine mollusks: Biological effects and ecological consequences. In *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida, USA.
- Moukrim, A., 2002. POPs ecotoxicology studies in the Moroccan coast., 2nd UNEP Regional WS on Transport Pathways and Effects of PTS.
- Mrosovsky, N., Baptistotte, C., Godfrey, M.H., 1999. Validation of incubation duration as an index of the sex ratio of hatchling sea turtles. *Can J Zool* 77, 831-835.
- Mrosovsky, N., Kamel, S., Rees, A.F., Margaritoulis, D., 2002. Pivotal temperature for loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Kyparissia Bay, Greece. *Can J Zool* 80, 2118-2124.
- Mrosovsky, N., Pieau, C., 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphib-Reptil* 12, 169-117.
- Mrosovsky, N., Yntema, C.L., 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: Implications for conservation practices. *Biol Conserv* 18, 59-65.
- Mulhern, B.M., Reichel, W.L., Locke, L.N., Lamont, T.G., Belisle, A., Cromartie, E., Bagley, G.E., Prouty, R.M., 1970. Organochlorine residues and autopsy data from bald eagles 1966-68. *Pestic Monit J* 4, 141-144.
- Murk, A.J., Boudewijn, T.J., Menninger, P.L., Bosveld, A.T., Rossaert, G., Ysebaert, T., Meire, P., Dirksen, S., 1996. Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons and related contaminants on common tern reproduction: integration of biological, biochemical, and chemical data. *Arch Environ Contamin Toxicol* 31, 128-140.
- Murray, A.P., Richardson, B.J., Gibbs, C.F., 1991. Bioconcentration factors for petroleum hydrocarbons, PAHs, LABs and biogenic hydrocarbons in the blue mussel. *Mar Poll Bull* 22, 595-603.
- Musick, J.A., Limpus, C.J., 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 137-164.
- Nakata, H., Sakai, Y., Miyawaki, T., Takemura, A., 2003. Bioaccumulation and toxic potencies of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in tidal flat and coastal ecosystems of the Ariake Sea, Japan. *Environ Sci Technol* 37, 3513-3521.
- Narahashi, T., 2002. Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. *Mini Rev Med Chem* 2, 419-432.
- Nascimento, R.S., Froes, R.E., e Silva, N.O., Naveira, R.L., Mendes, D.B., Neto, W.B., Silva, J.B., 2010. Comparison between ordinary least squares regression and weighted least squares regression in the calibration of metals present in human milk determined by ICP-OES. *Talanta* 80, 1102-1109.
- Natt, M.P., Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. *British Poultry Sci* 31, 735.
- Neff, J.M., 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Rand, G.M., Petrocilli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Hemisphere, New York, USA.
- Newman, S.H., Mazet, J.K., Ziccardi, M.H., Lieske, C.L., Fauquier, D.A., Gardner, I.A., Zinkl, J.G., Christopher, M.M., 1999. Haematological changes and anaemia associated with captivity and petroleum exposure in seabirds. *Comp Haematol Int* 9, 60-67.
- Nicoletto, P.F., Hendricks, A.C., 1988. Sexual differences in accumulation of mercury in 4 species of centrarchid fishes. *Can J Zool* 66, 944-949.
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Poll* 1B, 3-26.

- Nisbet, I.C.T., LaGoy, P.K., 1992. Toxic equivalent factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol* 16, 290-300.
- Norton, T.M., Keller, J.M., Peden-Adams, M., Day, R., Stedman, N., A., S., Greiner, E., Harms, C.A., Frick, M., Dood, M., Schroeder, B., et al., 2005. Debilitated loggerhead turtle (*Caretta caretta*) syndrome along the southeastern US coast: Incidence, pathogenesis, and monitoring. In: The 25th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-582, Savannah, Georgia, p. 36.
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ Int* 35, 971-986.
- Nriagu, J.O., 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338, 47-49.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- O'Neil, M.J., 2006. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 14th ed. Merck, Whitehouse Station, New York, USA.
- O'Shea, T.J., Tanabe, S., 2003. Persistent ocean contaminants and marine mammals: a retrospective overview. In: Vos, J.G., Bossart, G.D., Fournier, M., O'Shea, T.J. (Eds.), *Toxicology of Marine Mammals*, Taylor and Francis, London and New York, pp. 99-134.
- O'Shea, T.J., Geraci, J.R., 1999. Toxicology in marine mammals. In: Fowler, M.E., Miller, D.L. (Eds.), *Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 412-478.
- O'Shea, T.J., Tanabe, S., 2003. Persistent ocean contaminants and marine mammals: A retrospective overview. In: Vos, J.G., Bossart, G.D., Fournier, M., O'Shea, T.J. (Eds.), *Toxicology of Marine Mammals*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, USA and Canada, pp. 99-134.
- Okey, A.B., Riddick, D.S., Harper, P.A., 1994. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett* 70, 1-22.
- Orós, J., Arencibia, A., Monagas, P., 2012a. Anthropogenic causes of mortality of sea turtles in the Canary Islands: a multidisciplinary approach to the conservation of endangered sea turtles. In: Cosgrove, M.J., Roe, S.A. (Eds.), *Turtles: anatomy, ecology and conservation*. Nova Science Publishers, Inc, New York, pp. 53-86.
- Orós, J., Calabuig, P., Déniz, S., 2004. Digestive pathology of sea turtles stranded in the Canary Islands between 1993 and 2001. *Vet Rec* 155, 169-174.
- Orós, J., Camacho, M., Boada, L.D., Luzardo, O.P., 2012b. Pesticides and endangered sea turtles: a review. In: Abrego, A.J., Lugo, E.M. (Eds.), *Pesticides: Characteristics, uses and health implications*. Nova Science Publisher, Inc., New York.
- Orós, J., Camacho, M., Calabuig, P., Arencibia, A., 2011. Salt gland adenitis as only cause of stranding of loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *Dis Aquat Organ* 95, 163-166.
- Orós, J., Camacho, M., Calabuig, P., Arencibia, A., 2011. Salt gland adenitis as only cause of stranding of loggerhead sea turtles *Caretta caretta*. *Dis Aquat Organ* 95, 163-166.
- Orós, J., Camacho, M., Pascual, C., 2013. Diseases among loggerhead sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2011). In: Chitty, J., Marschang, R., Mayer, J., Speer, B., Lierz, M., Heffels-redmann, U., Ziegler, L. (Eds.), *1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine*. VVB Laufersweiler Verlag, Wiesbaden, Germany, p. 133.
- Orós, J., González-Díaz, O.M., Monagas, P., 2009. High levels of polychlorinated biphenyls in tissues of Atlantic turtles stranded in the Canary Islands, Spain. *Chemosphere* 74, 473-478.
- Orós, J., Torrent, A., Calabuig, P., Déniz, S., 2005. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Dis Aquat Organ* 63, 13-24.
- Orós, J., Torrent, A., Espinosa de los Monteros, A., Calabuig, P., Déniz, S., Tucker, S., Jacobson, E.R., 2001. Multicentric lymphoblastic lymphoma in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Vet Pathol* 38, 464-467.
- Owens, D.W., 1997. Hormones in the life history of sea turtles. In: Lutz, P.L., Musick, J.A. (Eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 315-341.
- Owens, D.W., Ruiz, G.J., 1980. New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 36, 17-20.

Ozdilek, H.G., Ozdilek, S.Y., 2007. Impact of corrosive trace elements on sea turtle eggs during embryonic growth. *Asian J Chem* 19, 807–809.

Páez-Osuna, F., Calderon-Campuzano, M.F., Soto-Jimenez, M.F., Ruelas-Inzunza, J.R., 2010a. Lead in blood and eggs of the sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from the Eastern Pacific: concentration, isotopic composition and maternal transfer. *Mar Pollut Bull* 60, 433-439.

Páez-Osuna, F., Calderon-Campuzano, M.F., Soto-Jimenez, M.F., Ruelas-Inzunza, J.R., 2010b. Trace metals (Cd, Cu, Ni, and Zn) in blood and eggs of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* from a nesting colony of Oaxaca, Mexico. *Arch Environ Contamin Toxicol* 59, 632-641.

Pandit, G.G., Sharma, S., Srivastava, P.K., Sahu, S.K., 2002. Persistent organochlorine pesticide residues in milk and dairy products in India. *Food Addit Contam* 19, 153-157.

Peden-Adams, M.M., 1999. Evaluation of Xenobiotic-Induced Immunotoxicity and CYP450 Activity in Wildlife Species, PhD Thesis. Clemson University, Clemson, USA.

Pelletier, M.C., Burgess, R.M., Ho, K.T., Kuhn, A., Mckinney, R.A., Ryba, S.A., 1997. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ Toxicol Chem* 16, 2190-2199.

Peña-Méndez, E.M., Astorga-España, M.S., García-Montelongo, F.J., 1999. Interpretation of analytical data on n-alkanes and polynuclear aromatic hydrocarbons in *Arbacia lixula* from the coasts of Tenerife (Canary Islands, Spain) by multivariate data analysis. *Chemosphere* 39, 2259-2270.

Peña-Méndez, E.M., Astorga-España, M.S., García-Montelongo, F.J., 2001. Chemical fingerprinting applied to the evaluation of marine oil pollution in the coasts of Canary Islands (Spain). *Environ Pollut* 111, 177-187.

Pérez, C., Velando, A., Munilla, I., López-Alonso, M., Oro, D., 2008. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in the marine environment after the Prestige oil spill by means of seabird blood analysis. *Environ Sci Technol* 42, 707-713.

Perrault, J., Wyneken, J., Thompson, L.J., Johnson, C., Miller, D.L., 2011. Why are hatching and emergence success low? Mercury and selenium concentrations in nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) and their young in Florida. *Mar Pollut Bull* 62, 1671-1682.

Perrine, D., 2003. Sea turtles of the world. Stillwater, M.N. (Ed.), Voyageur Press, p. 144.

Perugini, M., Giammarino, A., Olivieri, V., Guccione, S., Lai, O.R., Amorena, M., 2006. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticide levels in tissues of *Caretta caretta* from the Adriatic Sea. *Dis Aquat Organ* 71, 155-161.

Perugini, M., Visciano, P., Manera, M., Turno, G., Lucisano, A., Amorena, M., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Gulf of Naples, Tyrrhenian Sea. *J Agric Food Chem* 55, 2049-2054.

Peterle, T.J., 1991. Wildlife toxicology. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.

Pires, T.T., Rostan, G., Guimarães, J.E., 2006. Hematologic examination and total protein values of sea turtles of species *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), in captivity, from Praia do Forte, Mata de São João-Bahia. *Braz J Vet Res Anim Sci São Paulo* 43, 348-353.

Place, A.R., Lang, J., Gavasso, S., Jeyasuria, P., 2001. Expression of P450 (arom) in *Malaclemys terrapin* and *Chelydra serpentina*: a tale of two sites. *J Experim Zool* 290, 673-690.

Podreka, S., Georges, A., Maher, B., Limpus, C.J., 1998. The environmental contaminant DDE fails to influence the outcome of sexual differentiation in the marine turtle *Chelonia mydas*. *Environ Health Perspect* 106, 185-188.

Poloczanska, E.S., Limpus, C.J., Hays, G.C., 2009. Vulnerability of marine turtles to climate change. In: Sims, D.W. (Ed.), *Advances in marine Biology*. Academic Press, Burlington, pp. 151-211.

Pugh, R.S., Becker, P.R., 2001. Sea Turtle Contaminants: A Review and Annotated Bibliography, NISTIR 6700 ed. US Department of Commerce Report. NISTIR 6700, Charleston, USA.

Qu, W., Bi, X., Sheng, G., Lu, S., Fu, J., Yuan, J., Li, L., 2007. Exposure to polybrominated diphenyl ethers among workers at an electronic waste dismantling region in Guangdong, China. *Environ Int* 33, 1029-1034.

Ragland, J.M., Arendt, M.D., Kucklick, J.R., Keller, J.M., 2011. Persistent organic pollutants in blood plasma of satellite-tracked adult male loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Environ Toxicol Chem* 30, 1549-1556.

- Rainbow, P.S., White, S.L., 1990. Comparative accumulation of cobalt by three crustaceans: a decapod, an amphipod and a barnacle. *Aquat Toxicol* 16, 113-126.
- Rainwater, T.R., Reynolds, K.D., Canas, J.E., Cobb, G.P., Anderson, T.A., McMurry, S.T., Smith, P.N., 2005. Organochlorine pesticides and mercury in cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*) from northeastern Texas, USA. *Environ Toxicol Chem* 24, 665-673.
- Raphael, B.L., 2003. Chelonians (Turtles and Tortoises). In: Fowler, M.E., Miller, R.E. (Eds.), *Zoo and Wild Animal Medicine*. Saunders, 5th edition, Philadelphia, USA, pp. 48-58.
- Raskin, R.E., 2000. Reptilian complete blood count. In: Fudge, A.M. (Ed.), *Laboratory medicine (avian and exotic pets)*. W.B. Saunders Company, USA, pp. 193-197.
- Ratcliffe, D.A., 1967. Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. *Nature* 215, 201-210.
- Rattner, B.A., 2009. History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 18, 773-783.
- Rattner, B.A., Scheuhammer, A.M., Elliott, J.E., 2011. History of Wildlife Toxicology and the Interpretation of Contaminant Concentrations in Tissues. In: Beyer, W.N., Meador, J.P. (Eds.), *Environmental contaminants in biota. Interpreting Tissue Concentrations*. Taylor and Francis Group, Boca Ratón, USA, pp. 9-46.
- Rauschenberger, R.H., Wiebe, J.J., Sepulveda, M.S., Scarborough, J.E., Gross, T.S., 2007. Parental exposure to pesticides and poor clutch viability in American alligators. *Environ Sci Technol* 41, 5559-5563.
- Recchia, C.A., Read, A.J., 1989. Stomach contents of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, from the Bay of Fundy. *Can J Zool* 67, 2140-2146.
- Reddy, D.S., Ghanathay, V.V., Reddy, S.L., Shankariah, K., 1994. Hepatotoxic effects of hexachlorocyclohexane on carbohydrate metabolism of a freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Bull Environ Contam Toxicol* 53, 733-739.
- Reich, K.J., Bjorndal, K.A., Frick, M.G., Witherington, B.E., Johnson, C., Bolten, A.B., 2010. Polymodal foraging in adult female loggerheads (*Caretta caretta*). *Mar Biol* 157, 113-121.
- Reijnders, P.J.H., 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* 324, 456-457.
- Revelles, M., Carreras, C., Cardona, L., Marco, A., Bentivegna, F., Castillo, J.J., de Martino, G., Mons, J.L., Smith, M.B., Rico, C., et al., 2007. Evidence for an asymmetrical size exchange of loggerhead sea turtles between the Mediterranean and the Atlantic through the Straits of Gibraltar. *J Experim Biol Ecol* 349, 261-271.
- Richardson, K.L., Gold-Bouchot, G., Schlenk, D., 2009. The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles: Loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). *Comp Biochem Physiol* 150, 279-284.
- Richardson, K.L., Lopez Castro, M., Gardner, S.C., Schlenk, D., 2010. Polychlorinated biphenyls and biotransformation enzymes in three species of sea turtles from the Baja California peninsula of Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol* 58, 183-193.
- Robinson, B.H., 2009. E-waste: an assessment of global production and environmental impacts. *Sci Total Environ* 408, 183-191.
- Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, pp. 387-420.
- Rolland, R.M., 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *J Wildl Dis* 36, 615-635.
- Romero, I.A., Abbott, N.J., Bradbury, M.W.B., 1996. The blood-brain barrier in normal CNS and in metal-induced neurotoxicity. In: Chang, L.W. (Ed.), *Toxicology of Metals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, pp. 561-586.
- Rooney, A.A., Bermudez, D.S., Guillette, L.J., Jr., 2003. Altered histology of the thymus and spleen in contaminant-exposed juvenile American alligators. *J Morphol* 256, 349-359.
- Rosenburg, W.M., Dennis, T., 2005. Egg component comparisons within and among clutches of the diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*. *Copeia* 2005, 417-423.

- Roscales, J.L., González-Solís, J., Calabuig, P., Jiménez, B., 2011. Interspecies and spatial trends in polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Atlantic and Mediterranean pelagic seabirds. *Environ Pollut* 159, 2899-2905.
- Ross, P.S., De Swart, R.L., Addison, R., Van Loveren, H., Vos, J.G., Osterhaus, A.D., 1996. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: Wildlife at risk? *Toxicology* 112, 157-169.
- Ross, P.S., Ellis, G.M., Ikononou, M.G., Barrett-Lennard, L.G., Addison, R.F., 2000. High PCB concentrations in free-ranging Pacific killer whales, *Orcinus orca*: effects of age, sex and dietary preference. *Mar Poll Bull* 40, 504-515.
- Routti, H., Arukwe, A., Jenssen, B.M., Letcher, R.J., Nyman, M., Backman, C., Gabrielsen, G.W., 2010. Comparative endocrine disruptive effects of contaminants in ringed seals (*Phoca hispida*) from Svalbard and the Baltic Sea. *Comp Biochem Physiol* 152, 306-312.
- Russell, R.W., Gobas, F., Haffner, G.D., 1999. Maternal transfer and in ovo exposure of organochlorines in oviparous organisms: a model and field verification. *Environ Sci Technol* 33, 416-420.
- Rybitski, M.J., Hale, R.C., Musick, J.A., 1995. Distribution of organochlorine pollutants in Atlantic sea turtles. *Copeia* 2, 379-390.
- Safe, S., 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* 21, 51-88.
- Safe, S., 1993. Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ Health Perspec* 100, 259-268.
- Sakai, H., Ichihashi, H., Suganuma, H., Tatsukawa, R., 1995. Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs. *Mar Poll Bull* 30, 347-353.
- Sakai, H., Saeki, K., Ichihashi, H., Suganuma, H., Tanabe, S., Tatsukawa, R., 2000. Species-specific distribution of heavy metals in tissues and organs of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) and green turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese coastal waters. *Mar Poll Bull* 40, 701-709.
- Samour, J.H., Hewlett, J.C., Silvanose, C., Hasbun, C.R., Al-Ghais, S.M., 1998. Normal haematology of free-living green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Comp Haematol Int* 8, 102-110.
- Santos, A.L.Q., Malta, T.S., Mundim, A.V., Alves-Júnior, J.R.F., Carvalho, S.F.M., 2005. Variação dos constituintes bioquímicos sanguíneos de tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812) (*Testudinata*) mantidas em criatório comercial. *Arch Vet Sci* 10, 1-8.
- Santos, X., Pastor, D., Llorente, G.A., Albaiges, J., 1999. Organochlorine levels in Viperine snake *Natrix maura* carcasses from the Ebro Delta (NE Spain): sexual and size-related. *Chemosphere* 39, 2641-2650.
- Schechter, A., Birnbaum, L., Ryan, J.J., Constable, J.D., 2006. Dioxins: an overview. *Environ Res* 101, 419-428.
- Schenck, F.J., Wagner, R., 1995. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Addit Contam* 12, 535-541.
- Scheringer, M., 2009. Long-range transport of organic chemicals in the environment. *Environ Toxicol Chem* 28, 677-690.
- Schipper, J., Chanson, J.S., Chiozza, F., Cox, N.A., Hoffmann, M., Katariya, V., Lamoreux, J., Rodrigues, A.S., Stuart, S.N., Temple, H.J., et al., 2008. The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge. *Science* 322, 225-230.
- Schlezinger, J.J., Keller, J., Verbrugge, L.A., Stegeman, J.J., 2000. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl oxidation in fish, bird and reptile species: relationship to cytochrome P450 1A inactivation and reactive oxygen production. *Comp Biochem Physiol* 125, 273-286.
- Schumacher, I.M., Herbst, L.H., Kerben, M.J., Ehrhart, L.M., Bagley, D.A., Klein, P.A., 1998. Vitellogenin levels in green turtles (*Chelonia mydas*). In: Epperly, S.P., Braun, J. (Eds.), *Proceedings of the 17th Annual Sea Turtle Symposium*. Dep. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-415, U.S., pp. 68-270.
- Schwacke, L.H., Voit, E.O., Hansen, L.J., Wells, R.S., Mitchum, G.B., Hohn, A.A., Fair, P.A., 2002. Probabilistic risk assessment of reproductive effects of polychlorinated biphenyls on bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeast United States Coast. *Environ Toxicol Chem* 21, 2752-2764.

- Schwartz, F.J., 1988. Aggregations of Young Hatchling Loggerhead Sea Turtles in the Sargassum off North Carolina. *Mar Turtle Newsl* 42, 9-10.
- Seaman, G.A., Lowry, L.F., Frost, K.J., 1982. Foods of belukha whales *Delphinapterus leucas* in Western Alaska. *Cetology* 44, 1-19.
- Seegal, R.F., Bush, B., Shain, W., 1991. Neurotoxicology of ortho-substituted polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 23, 1941-1949.
- Seidel, W.R., McVea, C.J., 1995. Development of a sea turtle excluder shrimp trawl for the southeast U.S. penaeid shrimp fishery. In: Bjorndal, K.A. (Ed.), *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., pp. 497-502.
- Seminoff, J.A., Resendiz, A., Resendiz, B., Nichols, W.J., 2004. Occurrence of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the Gulf of California, Mexico: evidence of life-history variation in the Pacific Ocean. *Herpetol Rev* 35, 24-27.
- Sheehan, D.M., Willingham, E., Gaylor, D., Bergernon, J.M., Crews, D., 1999. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect* 107, 155-159.
- Sipes, I.G., Gandolfi, A.J., 1991. Biotransformation of toxicants. In: Ambur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.O. (Eds.), *The basic science of poisons*. 4th Edn. McGraw-Hill, Inc., New York, USA, pp. 88-126.
- Smith, A.G., Gangolli, S.D., 2002. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. *Food Chem Toxicol* 40, 767-779.
- Smith, G.J., Hall, R.J., 1994. Wildlife toxicology. In: Cockerham, L.G., Shane, B.S. (Eds.), *Basic Environmental Toxicology*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA, pp. 409-424.
- Soria, M.L., Repetto, G., Repetto, M., 1995. Revisión general de la toxicología de los metales. In: Repetto, M. (Ed.), *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos, S.A., Madrid, España, pp. 293-358.
- Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.K., 2010. Recent advancements in amphibian and reptile ecotoxicology. In: Sparling, D.W., Linder, G., Bishop, C.A., Krest, S.K. (Eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Taylor and Francis Group, Boca Ratón. Published in collaboration with the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). New York, USA, pp. 1-12.
- Speake, B.K., Thompson, M.B., Thacker, F.E., Bedford, G.S., 2003. Distribution of lipids from the yolk to the tissues during development of the water python (*Liasis fuscus*). *Comp Biochem Physiol* 173, 541-547.
- Spotila, J.R., 2004. *Sea turtles. A complete guide to their biology, behavior, and conservation*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA, p. 228.
- Srinivasan, K., Ramesh, H.P., Radhakrishnamurty, R., 1984. Renal tubular dysfunction caused by dietary hexachlorocyclohexane (HCH) isomers. *J Environ Sci Health B* 19, 453-466.
- Ssebugere, P., Wasswa, J., Mbabazi, J., Nyanzi, S.A., Kiremire, B.T., Marco, J.A., 2010. Organochlorine pesticides in soils from south-western Uganda. *Chemosphere* 78, 1250-1255.
- Stamper, M.A., Harms, C., Epperly, S.P., Braun-McNeill, J., Stoskopf, M.K., 2005. Relationship between barnacle epibiotic load and hematologic parameters in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*), a comparison between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. *J Zoo Wildl Med* 36, 635-641.
- Stewart, K.R., Keller, J.M., Templeton, R., Kucklick, J.R., Johnson, C., 2011. Monitoring persistent organic pollutants in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) confirms maternal transfer. *Mar Pollut Bull* 62, 1396-1409.
- Stoica, A., Pentecost, E., Martin, M.B., 2000. Effects of arsenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 141, 3595-3602.
- Storelli, M.M., Barone, G., Marcotrigiano, G.O., 2007. Polychlorinated biphenyls and other chlorinated organic contaminants in the tissues of Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Sci Total Environ* 373, 456-463.
- Storelli, M.M., Ceci, E., Marcotrigiano, G.O., 1998a. Comparison of total mercury, methylmercury, and selenium in muscle tissues and in the liver of *Stenella coeruleoalba* (Meyen) and *Caretta caretta* (Linnaeus). *Environ Contam Toxicol* 61, 541-547.
- Storelli, M.M., Ceci, E., Marcotrigiano, G.O., 1998b. Distribution of heavy metal residues in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimen beached along the Adriatic Sea (Italy). *Bull Environ Contam Toxicol* 60, 546-552.



- Storelli, M.M., Marcotrigiano, G.O., 2000. Chlorobiphenyls, HCB, and organochlorine pesticides in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimens beached along the adriatic sea, Italy. *Bull Environ Contam Toxicol* 64, 481-488.
- Storelli, M.M., Marcotrigiano, G.O., 2003. Heavy metal residues in tissues of marine turtles. *Mar Pollut Bull* 46, 397-400.
- Storelli, M.M., Storelli, A., D'Addabbo, R., Marano, C., Bruno, R., Marcotrigiano, G.O., 2005. Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the eastern Mediterranean Sea: overview and evaluation. *Environ Pollut* 135, 163-170.
- Strandberg, B., Bandh, C., van Bavel, B., Bergqvist, P.A., Broman, D., Naf, C., Pettersen, H., Rappe, C., 1998. Concentrations, biomagnification and spatial variation of organochlorine compounds in a pelagic food web in the northern part of the Baltic Sea. *Sci Total Environ* 217, 143-154.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1786.
- Subramanian, A., Tanabe, S., Tatsukawa, R., 1988a. Estimating some biological parameters of Baird's beaked whales using PCBs and DDEs as tracers. *Mar Poll Bull* 19, 284-287.
- Subramanian, A., Tanabe, S., Tatsukawa, R., 1988b. Use of organochlorines as chemical tracers in determining some reproductive parameters in Dalli-type Dall's porpoise *Phocoenoides dalli*. *Mar Environ Res* 25, 161-174.
- Sullivan, L.C., Orgeig, S., Wood, P.G., Daniels, C.B., 2001. The ontogeny of pulmonary surfactant secretion in the embryonic green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Physiol Biochem Zool* 74, 493-501.
- Sunol, C., Vale, C., Rodríguez-Farre, E., 1998. Polychlorocycloalkane insecticide action on GABA- and glycine-dependent chloride flux. *Neurotoxicology* 19, 573-580.
- Suzuki, K., Noda, J., Yanagisawa, M., Kawazu, I., Sera, K., Fukui, D., Asakawa, M., Yokota, H., 2012. Particle-induced X-ray emission analysis of elements in plasma from wild and captive sea turtles (*Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas*, and *Caretta caretta*) in Okinawa, Japan. *Biol Trace Element Res* 148, 302-308.
- Swarthout, R.F., Keller, J.M., Peden-Adams, M., Landry, A.M., Fair, P.A., Kucklick, J.R., 2010. Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the Gulf of Mexico. *Chemosphere* 78, 731-741.
- Swimmer, J.Y., 2000. Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. *J Wildl Dis* 36, 102-110.
- Szefer, P., Szefer, K., Pempkowiak, J., Skwarzec, B., Bojanowski, R., Holm, E., 1994. Distribution and coassociations of selected metals in seals of the Antarctic. *Environ Pollut* 83, 341-349.
- Tanabe, S., Hidaka, H., Tatsukawa, R., 1983. PCBs and chlorinated pesticides in Antarctic atmosphere and hydrosphere. *Chemosphere* 12, 277-288.
- Tanabe, S., Kannan, N., Subramanian, A., Watanabe, S., Tatsukawa, R., 1987. Highly toxic coplanar PCBs: occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. *Environ Pollut* 47, 147-163.
- Tanabe, S., Kunisue, T., 2007. Persistent organic pollutants in human breast milk from Asian countries. *Environ Pollut* 146, 400-413.
- Tanabe, S., Madhusree, B., Öztürk, A.A., Tatsukawa, R., Miyazaki, N., Özdamar, E., Aral, O., Samsun, O., Öztürk, B., 1997. Persistent organochlorine residues in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the Black Sea. *Mar Poll Bull* 34, 338-347.
- Tanabe, S., Mori, T., Tatsukawa, R., 1984. Bioaccumulation of DDTs and PCBs in southern minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Proceedings of the Sixth Symposium on Polar Biology. Mem Nat Inst Polar Res (Japan), Japan, pp. 140-150.
- Tanabe, S., Tatsukawa, R., Maruyama, K., Miyazaki, N., 1982. Transplacental transfer of PCBs and chlorinated hydrocarbon pesticides from the pregnant striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) to the fetus. *Agr Biol Chem* 46, 1249-1254.
- Tangredi, B.P., Evans, R.H., 1997. Organochlorine pesticides associated with ocular, nasal, or otic infection in the eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). *J Zoo Wildl Med* 28, 97-100.

- Tao, S., Liu, W.X., Li, X.Q., Zhou, D.X., Li, X., Yang, Y.F., Yue, D.P., Coveney, R.M., 2009. Organochlorine pesticide residuals in chickens and eggs at a poultry farm in Beijing, China. *Environ Pollut* 157, 497-502.
- Tavares-Días, M., Oliveira-Junior, A.A., Silva, M.G., Marcon, J.L., Barcellos, J.F.M., 2009. Comparative hematologic and biochemical analysis for giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Vet Archiv* 79, 601-610.
- Thorbjarnarson, J., Lagueux, C., Bolze, D., Klemens, M., Meylan, A., 2000. Human use of turtle: a worldwide perspective. In: Klemens, M. (Ed.), *Turtle Conservation*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 33-84.
- Tillet, D.E., Ankley, G.T., Verbrugge, D.A., Giesey, J.P., Lugwig, J.P., Kubiak, T.J., 1991. H4IIE rat hepatoma cell bioassay-derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents in colonial fish-eating waterbird eggs from the Great Lakes. *Arch Environ Contamin Toxicol* 21, 91-101.
- Torrent, A., Déniz, S., Ruiz, A., Calabuig, P., Sicilia, J., Orós, J., 2002. Esophageal diverticulum associated with *Aerococcus viridans* infection in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *J Wildl Dis* 38, 221-223.
- Torrent, A., González-Díaz, O.M., Monagas, P., Orós, J., 2004. Tissue distribution of metals in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Mar Pollut Bull* 49, 854-860.
- Tsuda, T., Nakanishi, H., Sideru, A., Takebayashi, J., 1988. Bioconcentration and metabolism of butyltin compounds in carp. *Water Res* 22, 647-651.
- Turnbull, B.S., Smith, C.R., Stamper, M.A., 2000. Medical implications of hypothermia in threatened loggerhead (*Caretta caretta*) and endangered kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. Proceedings AAZV and IAAAM joint Conference, 31-35.
- US Environmental Protection Agency (USEPA), 1980. Ambient water quality criteria for polycyclic aromatic hydrocarbons. Criteria and Standards Division, Environmental Protection Agency, Washington, D.C. p. A-1 to B-6. EPA-440/5-80-069.
- van de Merwe, J.P., Hodge, M., Olszowy, H.A., Whittier, J.M., Lee, S.Y., 2010. Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Mar Pollut Bull* 60, 579-588.
- Van de Vijver, K.I., Hoff, P.T., Das, K., Van Dongen, W., Esmans, E.L., Siebert, U., Bouquegneau, J.M., Blust, R., De Coen, W.M., 2004. Baseline study of perfluorochemicals in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from Northern Europe. *Mar Pollut Bull* 48, 992-997.
- van den Berg, H., 2009. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ Health Perspect* 117, 1656-1663.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., et al., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 106, 775-792.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., et al., 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Soc Toxicol* 93, 223-241.
- Van den Berg, M., De Jongh, J., Poiger, H., Olson, J.R., 1994. The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* 24, 1-74.
- Van Meter, R.J., Spotila, J.R., Avery, H.W., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect survival and development of common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) embryos and hatchlings. *Environ Pollut* 142, 466-475.
- Van Metre, P.C., Mahler, B.J., Furlong, E.T., 2000. Urban sprawl leaves its PAH signature. *Environ Sci Technol* 34, 4064-4070.
- Vargo, S., Lutz, P., Odell, D., Van Vleet, E., Bossart, G., 1986. Study of the effects of oil on marine turtles. Final Report. MMS 86-0070. Department of the Interior, Minerals Management Service, Vienna, Virginia, USA.
- Verreault, J., Villa, R.A., Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U., Letcher, R.J., 2006. Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of Arctic-breeding glaucous gulls. *Environ Pollut* 144, 1053-1060.
- Viberg, H., Fredriksson, A., Jakobsson, E., Orn, U., Eriksson, P., 2003. Neurobehavioral derangements in adult mice receiving decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) during a defined period of neonatal brain development. *Soc Toxicol* 76, 112-120.

- Villa, S., Finizio, A., Díaz, R., Vighi, M., 2003. Distribution of organochlorine pesticides in pine needles of an oceanic islands: the case of Tenerife (Canary Islands, Spain). *Water Air Soil Poll* 143, 335-349.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Tox* 30, 71-133.
- Wagemann, R., Trebacz, E., Boila, G., Lockhart, W.L., 1998. Methylmercury and total mercury in tissues of arctic marine mammals. *Sci Total Environ* 218, 19-31.
- Walker, C.H., 1980. Species variations in some hepatic drug metabolizing enzymes. *Progress Drug Metabol* 5, 113-164.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor and Francis Ltd, USA.
- Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J., Fromentin, J.M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389-395.
- Wallace, B.P., Williams, C.L., Paladino, F.V., Morreale, S.J., Lindstrom, R.T., Spotila, J.R., 2005. Bioenergetics and diving activity of internering leatherback turtles *Dermochelys coriacea* at Parque Nacional Marino Las Baulas, Costa Rica. *J Experim Biol* 208, 3873-3884.
- Wallach, J.D., Boever, W.J., 1993. *Diseases of exotic animals: medical and surgical management*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Wang, H., 2005. Trace metal uptake and accumulation pathways in kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*). Phd Tesis, Doctor of philosophy, University of Texas, USA.
- Weber, R., Gaus, C., Tysklind, M., Johnston, P., Forter, M., Hollert, H., Heinisch, E., Holoubek, I., Lloyd-Smith, M., Masunaga, S., et al., 2008. Dioxin- and POP-contaminated sites--contemporary and future relevance and challenges: overview on background, aims and scope of the series. *Environ Sci Pollut Res Int* 15, 363-393.
- Weijs, L., Dirtu, A.C., Das, K., Gheorghe, A., Reijnders, P.J., Neels, H., Blust, R., Covaci, A., 2009. Inter-species differences for polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in marine top predators from the Southern North Sea: Part 2. Biomagnification in harbour seals and harbour porpoises. *Environ Pollut* 157, 445-451.
- Whitaker, B.R., Krum, H., 1999. Medical management of sea turtles in aquaria. In: Fowler, M.E., Millan, E. (Eds.), *Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 217-231.
- Who, 1976. Polychlorinated biphenyl and terphenyls. World Health Organization, Geneva, Suiza, p. 85.
- Wibbels, T., Bull, J.J., Crews, D., 1991. Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *J Experim Zool* 260, 371-381.
- Wibbles, T., Owens, D.W., Limpus, C.J., Reed, P.C., Amoss, M.S.J., 1990. Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *General and Comparative Endocrinology* 79, 154-164.
- Wiig, Ø., 1998. Survival and reproductive rates for polar bears at Svalbard. *Int Conf Bear Res* 10.
- Wikteliuss, S., Edwards, C.A., 1997. Organochlorine insecticide residues in African Fauna: 1971-1995. *Rev Environ Contamin Toxicol* 151, 1-37.
- Wilcox, B.A., Aguirre, A.A., 2004. One ocean, one health. *EcoHealth* 1, 211-212.
- Wilkinson, R., 2004. Clinical pathology. In: McArthur, S., Wilkinson, R., Meyer, J. (Eds.), *Medicine and Surgery of Tortoise and Turtles*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 141-186.
- Williams, E.S., Panko, J., Paustenbach, D.J., 2009. The European Union's REACH regulation: a review of its history and requirements. *Crit Rev Toxicol* 39, 553-575.
- Willingham, E., Baldwin, R., Skipper, J.K., Crews, D., 2000. Aromatase activity during embryogenesis in the brain and adrenal-kidney-gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 119, 202-207.
- Willingham, E., Crews, D., 1999. Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 113, 429-435.

Willingham, E.J., 2001. Embryonic exposure to low-dose pesticides: effects on fitness parameters in the hatchling red-eared slider turtle. *Toxicol Environ Health* 64, 257–272.

Witham, R., 1995. Disruption of sea turtle habitat with emphasis on human influence. In: Bjorndal, K.A. (Ed.), *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Edición revisada. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp. 519-522.

Wolf, K.N., Harms, C.A., Beasley, J.F., 2008. Evaluation of five clinical chemistry analyzers for use in health assessment in sea turtles. *J Am Vet Med Assoc* 233, 470-475.

Wong, P.S., Matsumura, F., 2007. Promotion of breast cancer by beta-hexachlorocyclohexane in MCF10AT1 cells and MMTV-neu mice. *BMC Cancer* 7, 130.

Work, T.M., Balazs, G.H., 1999. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *J Wildl Dis* 35, 804-807.

Work, T.M., Rameyer, R.A., Balazs, G.H., Cray, C., Chang, S.P., 2001. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *J Wildl Dis* 37, 574-581.

Work, T.M., Raskin, R.E., Balazs, G.H., Whittaker, S.D., 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *Am J Vet Res* 59, 1252-1257.

Wright, P.J., Tillitt, D.E., 1999. Embryotoxicity of Great Lakes lake trout extracts to developing rainbow trout. *Aquatic Toxicol* 47, 77-92.

Wyneken, J., Mader, D.R., Weber III, E.S., Merigo, C., 2006. Medical care of sea turtles. In: Mader, D.R. (Ed.), *Reptile Medicine and Surgery*. Saunders, Elsevier Inc., St. Louis, Missouri, USA, pp. 972–1007.

Ylitalo, G.M., Matkin, C.O., Buzitis, J., Krahn, M.M., Jones, L.L., Rowles, T., Stein, J.E., 2001. Influence of life-history parameters on organochlorine concentrations in free-ranging killer whales (*Orcinus orca*) from Prince William Sound, AK. *Sci Total Environ* 281, 183-203.

Yntema, C.L., Mrosovsky, N., 1979. Incubation temperature and sex ratio in hatchling loggerhead turtles: a preliminary report. *Mar Turtle Newsl* 11, 9-10.

Yu, S., Halbrook, R.S., Sparling, D.W., 2012. Accumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and evaluation of hematological and immunological effects of PCB exposure on turtles. *Bull Environ Contam Toxicol* 88(6), 823-827.

Ziswiler, V., 1986. Clase Reptiles Reptilia. In: Omega (Ed.), *Zoología especial Vertebrados Tomo II: Amniotas*, Barcelona, Spain, pp. 23-72.

Zou, E., Matsumura, F., 2003. Long-term exposure to beta-hexachlorocyclohexane (beta-HCH) promotes transformation and invasiveness of MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 66, 831-840.

Zumbado, M., Goethals, M., Álvarez-León, E.E., Luzardo, O.P., Cabrera, F., Serra-Majem, L., Domínguez-Boada, L., 2005. Inadvertent exposure to organochlorine pesticides DDT and derivatives in people from the Canary Islands (Spain). *Sci Total Environ* 339, 49-62.

## 2. Referencias electrónicas

Aresco, M.J., James, F.C., 2005. Ecological relationships of turtles in north Florida lakes: a study of omnivory and the structure of a lake food web. Final report, Contract NG01-011, Tallahassee (Florida): Florida Fish and Wildlife Conservation Commission. Available from: Disponible en: <http://www.lakejacksonturtles.org/aresco/arescojames2005>.

Cobbing M. Toxic Tech: Not in Our Backyard. Uncovering the Hidden Flows of e-waste. Greenpeace International, (2008). Disponible en: <http://www.greenpeace.org/raw/content/belgium/fr/press/reports/toxic-tech.pdf>

Commission Decision Implementing Council Directive N° 96/23/CE of August 12. (2002) Off J Eur Union, L 221/18. Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>  
IARC (1987) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7 (1987). Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/index.php>

IMO (2007) Canary Islands as a Particularly Sensitive Sea Area (PSSA) by the International Maritime Organization (IMO). <http://www.imo.org/OurWork/Environment/pollutionprevention/pssas/Pages/Default.aspx>

IPCC (2007) Climate Change 2007: the physical basis. Contribution of Working Group I to the fourth assessment. Report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge. Disponible en: [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/publications\\_ipcc\\_fourth\\_assessment\\_report\\_wg1\\_report\\_the\\_physical\\_science\\_basis.htm](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_wg1_report_the_physical_science_basis.htm)

IUCN (2012) The International Union for Conservation of Nature (IUCN). IUCN Red List of Threatened Species. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/3897/0>

Jacobson, E., Bjorndal, K., Bolten, A., Herren, R., Harman, G., Wood, L., 2007. Establishing plasma biochemical and hematocrit reference intervals for sea turtles in Florida. [http://accstr.ufl.edu/blood\\_chem.htm/](http://accstr.ufl.edu/blood_chem.htm/)

PNUMA (2007) Guía para el plan de vigilancia mundial de contaminantes orgánicos persistentes. Disponible en: [http://www.pops.int/documents/meetings/effeval/guidance\\_sp/guidance\\_esp.pdf](http://www.pops.int/documents/meetings/effeval/guidance_sp/guidance_esp.pdf)

UN/DESA (2002) Changing Unsustainable Patterns of Consumption and Production, Johannesburg Plan on Implementation of the World summit on Sustainable Development, Johannesburg, 2002 (Chapter III). Disponible en: [http://www.un.org/esa/sustdev/documents/WSSD\\_POI\\_PD/English/POIChapter3.htm](http://www.un.org/esa/sustdev/documents/WSSD_POI_PD/English/POIChapter3.htm)

UNEP. Basel Convention on the Control of Transboundary Movements of HazardousWastes and their Disposal. United Nations Environment Programme. (2009) <http://www.basel.int/>

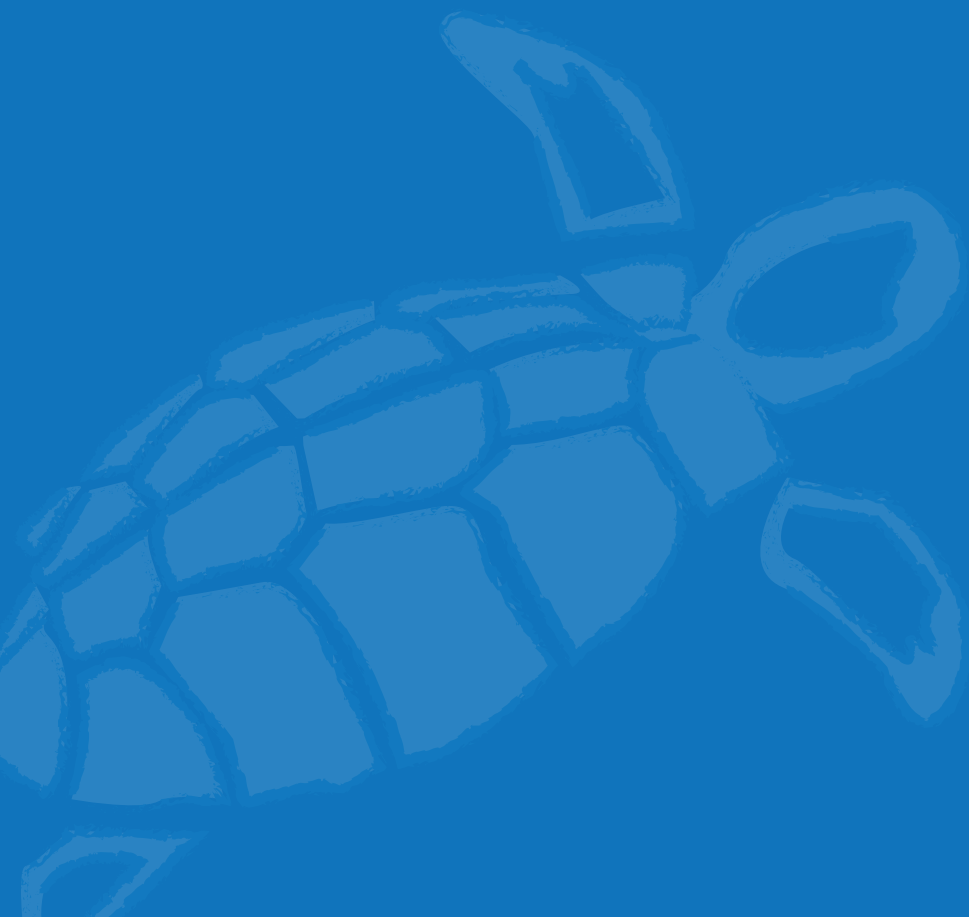
United Nations Environment Programme. (2001a). Stockholm convention on persistent organic pollutants. Disponible en: [http://www.pops.int/documents/convtext/convtext\\_en.pdf](http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf)

United Nations Environment Programme. (2001b). Stockholm convention on persistent organic pollutants: status of ratification Disponible en: <http://chm.pops.int/Countries/StatusofRatification/tabid/252/language/es-CO/Default.aspx>

United Nations Environment Programme. (2001c). Stockholm convention on persistent organic pollutants: the new 9 substances under the Stockholm Convention Disponible en: <http://chm.pops.int/Programmes/NewPOPs/The9newPOPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>



# GLOSARIO







## Glosario

**4,4'-DDD\*:** Dichlorodiphenyldichloroethane - Diclorodifenildicloroetano (IUPAC 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano).

**4,4'-DDE\*:** Dichlorodiphenyldichloroethylene - Diclorodifenildicloroetileno (IUPAC 1,1-dicloro-2,2-bis(p-metoxifenil)etano).

**4,4'-DDT\*:** Dichlorodiphenyltrichloroethane - DiclorodifenilTricloroetano (IUPAC 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-metoxifenil)etano).

**AEF:** Factor de enriquecimiento antropogénico.

**AENOR:** Asociación Española de Normalización.

**AhR\*:** Aryl hydrocarbon Receptor - Receptor aril hidrocarburo.

**Al:** Aluminio- Aluminum.

**ALP:** Fosfatasa alcalina - Alkaline phosphatase.

**ALT:** Alanino aminotransferasa - Alanine aminotransferase.

**As:** Arsénico - Arsenic.

**AST:** Aspartato aminotransferasa – Aspartate aminotransferase.

**ATPasa:** Adenosina trifosfatasa.

**AX-ICP-OES\*:** Axial Configuration of the Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy - Configuración axial de la Espectroscopía de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente.

**BUN:** Nitrógeno ureico sanguíneo - Blood urea nitrogen.

**CCL:** Curve carapace length – Largo curva del caparazón (LCC).

**Cd:** Cadmio – Cadmium.

**CIPs:** Contaminantes Inorgánicos Persistentes.

**CITES:** Convention of International Trade in Endangered Species - Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres.

**COPs:** Contaminantes Orgánicos Persistentes.

**Cr:** Cromo – Chrome.

**CRFS:** Centro de Recuperación de Fauna Silvestre - Tafira Wildlife Rehabilitation Center (Tafira-WRC).

**CPK:** Creatina fosfoquinasa - Creatine phosphokinase.

**CTPs:** Contaminantes Tóxicos Persistentes.

**CTS:** Cuentas por segundo.

**Cu:** Cobre – Copper.

**DDT:** Diclorodifeniltricloroetano.

**DE:** Disruptor Endocrino.

**DES:** Dietilestilbestrol.

**DL-PCB\*:** Dioxin-like PCB - PCB análogo a las dioxinas.

**DRE\*:** Dioxin Responsive Element - Elemento de respuesta a las dioxinas.

**DSDT:** Determinación sexual es dependiente de la temperatura.

**EDTA:** Ácido etilendiaminetetraacético.

**E-waste\*:** Electronic waste - Basura electrónica.

**FAO\*:** Food and Agricultural Organization - Organización para la Agricultura y la Alimentación.

**GABA\*:** Gamma-aminobutyric acid - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico.

**GC-MS\*:** Gas chromatography/Mass spectrometry - Cromatografía de gases /Espectrometría de masas.

**GC-QqQ-MS:** Sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masas de triple cuadrupolo- TriPlus Autosampler and coupled to a Triple Quadrupole Mass Spectrometer Quantum XLS.

**GGT:**  $\gamma$ -glutamyl transferasa -  $\gamma$ -glutamyl transferase.

**HCB:** Hexaclorobenceno – Hexachlorobenzene.

**HCH:** Hexaclorociclohexano – Hexachlorocyclohexane.

**Hg:** Mercurio – Mercury.

**IARC\*:** International Agency for Research on Cancer - Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer.

**ICP-OES\*:** Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy - Espectroscopía de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente.

**IMO:** International Maritime Organization - Organización Marítima Internacional.

**IPs:** Puntos de Identificación.

**IPCC\*:** Intergovernmental Panel on Climate Change - Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático.

**IUCN\*:** The International Union for Conservation of Nature - Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

**LCC:** Longitud curva del caparazón - Curve carapace length (CCL).

**LDH:** Lactato deshidrogenasa - Lactate dehydrogenase.

**LRC:** Longitud recta de caparazón -Straight carapace length (SCL).

**LOD:** Límite de detección- Limit of detection.

**LOQ:** Límite de cuantificación.

**M-PCBs\*:** Marker Polychlorinated biphenyls – Bifenilos policlorados marcadores.

**MeHg:** Metilmercurio

**MFOs:** Oxidasas de función mixta.

**Mn:** Manganese – Manganese.

**Ni:** Níquel - Nickel.

**OCs:** Organoclorados – Organochlorine contaminants.

**OCPs:** Organochlorine pesticides - Pesticidas organoclorados (POCs).

**OMS:** Organización mundial de la salud.

***p,p'*-DDD:** Dichlorodiphenyldichloroethane - Diclorodifenildicloroetano (IUPAC 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano).

***p,p'*-DDE:** Dichlorodiphenyldichloroethylene - Diclorodifenildicloroetileno (IUPAC 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-metoxifenil)etano).

***p,p'*-DDT:** Dichlorodiphenyltrichloroethane - DiclorodifenilTricloroetano (IUPAC 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-metoxifenil)etano).

**PAHs\*:** Polycyclic aromatic hydrocarbons - Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

**PAR:** Para análisis de residuos.

**Pb:** Plomo – Lead.

**PBDEs\*:** Polybrominated diphenylethers - Difeniléteres polibrominados.

**PCBs\*:** Polychlorinated Biphenyls - Bifenilos policlorados.

**PCDD\*:** Poly-chlorinated Dibenzo-*p*-dioxin - Dibenzo-*p*-dioxinas policloradas.

**PCDF\*:** Poly-chlorinated Dibenzofuran - Dibenzofuranos policlorados.

**PCV:** Packed cell volumen – Hematocrito.

**PFAs:** Sustancias perfluoroalquiladas.

**PIT:** Passive Integrated Transponder – Microchip.

**PNUMA:** Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente.

**POCs:** Plaguicidas organoclorados - Organochlorine pesticides (OCPs).

**POPs:** Persistent organic pollutant – Contaminantes orgánicos persistentes (COPs).

**PSSA:** Particularly Sensitive Sea Area - Zona marina especialmente sensible.

**RA:** Receptor de andrógenos.

**RBC:** Glóbulos rojos totales - Red blood cell count.

**RD-ICP-OX\*:** Radial configuration of the Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy - Configuración radial de la Espectroscopía de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente.

**RE:** Receptor de estrógenos.

**REACH\*:** Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals - Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de las sustancias químicas.

**RP:** Receptor de progesterona.

**RT:** Receptor de hormonas tiroideas.

**SCL:** Straight carapace length – Largo recto de caparazón.

**Se:** Selenio – Selenium.

**SETAC:** The Society of Environmental Toxicology and Chemistry.

**SPE:** Extracción en fase sólida.

**SRM:** Monitorización de reacciones seleccionadas.

**TWRC:** Tafira Wildlife Rehabilitation Center - Centro de recuperación de fauna silvestre de Tafira.

**TED:** Turtle excluded device - Dispositivo excluidor de tortugas.

**TEF\*:** Toxic Equivalence Factor - Factor de equivalencia de toxicidad.

**UNEP\*:** United Nations for Environmental Protection - Naciones Unidas para la protección del medio ambiente.

**USEPA\*:** US Environmental Protection Agency (USEPA)- Agencia de protección del medio ambiente de los Estados Unidos.

**WBC:** Glóbulos blancos totales - White blood cell count.

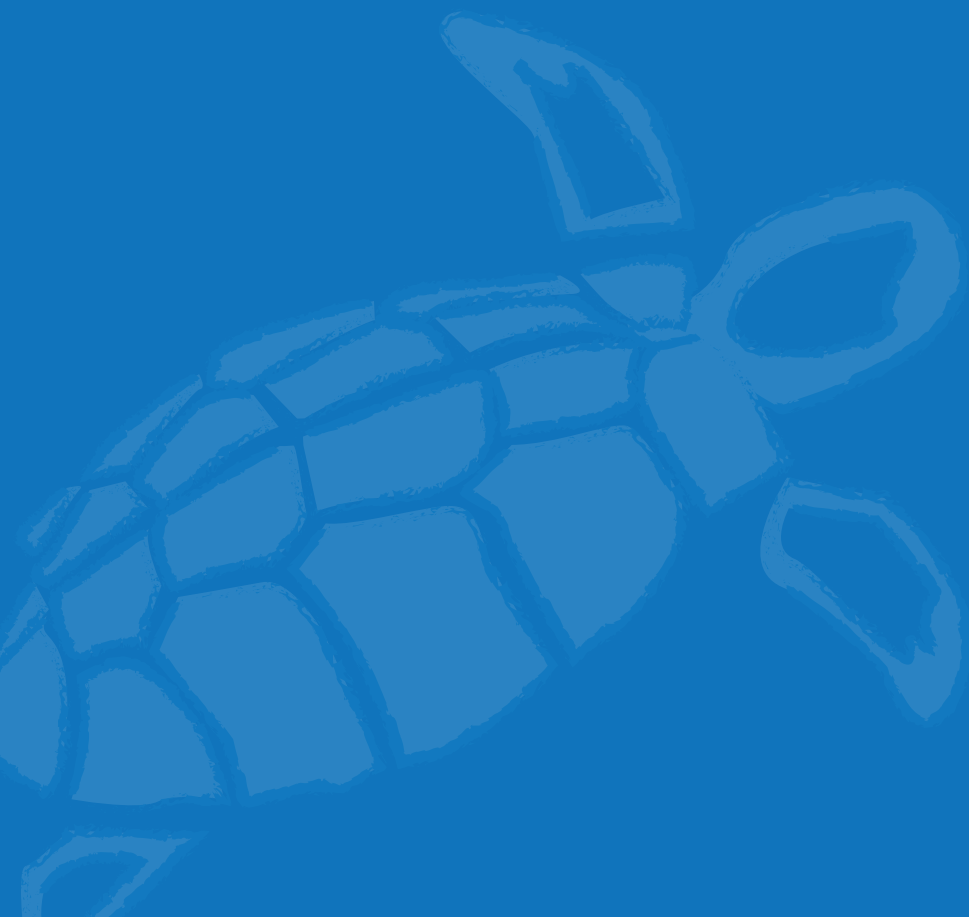
**WHO\*:** World Health Organization - Organización Mundial de la Salud.

**Zn:** Zinc.

*\* Siglas internacionalmente aceptadas. Hemos mantenido, por tanto, su denominación original e indicamos su significado tanto en lengua inglesa como española.*

# ANEXO 1

Crude oil as stranding cause  
among loggerhead sea turtles  
(*Caretta caretta*) in the Canary  
Islands, Spain (1998-2011)



**ANEXO I**

**Crude oil as stranding cause among loggerhead sea turtles**

**(*Caretta caretta*) in the Canary Islands, Spain (1998-2011) .....283**

## Crude Oil as a Stranding Cause among Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) in the Canary Islands, Spain (1998–2011)

María Camacho,<sup>1</sup> Pascual Calabuig,<sup>2</sup> Octavio P. Luzardo,<sup>3</sup> Luis D. Boada,<sup>3</sup> Manuel Zumbado,<sup>3</sup> and Jorge Orós<sup>1,4</sup> <sup>1</sup>Veterinary Faculty, University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Trasmontana s/n, 35416 Arucas (Las Palmas), Spain; <sup>2</sup>Tafira Wildlife Rehabilitation Center, Tafira Baja, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; <sup>3</sup>Toxicology Unit, Department of Clinical Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), PO Box 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; <sup>4</sup>Corresponding author (email: joros@dmor.ulpgc.es)

**ABSTRACT:** We report the number of strandings caused by crude oil among loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in the Canary Islands between 1998 and 2011 and analyze the impact of the designation of the Canary Islands as a Particularly Sensitive Sea Area (PSSA) in 2005. Among 1,679 stranded loggerhead turtles, 52 turtles stranded due to crude oil (3.1%). The survival rate of the turtles stranded by crude oil was 88%. All turtles that died because of crude oil stranding had signs of ingestion of crude oil and lesions, included esophageal impaction, necrotizing gastroenteritis, necrotizing hepatitis, and tubulonephrosis. The number of strandings caused by crude oil after 2005 was significantly lower than it was before 2006. We show that the designation of the Canary Islands as a PSSA in 2005 by the International Maritime Organization was associated with a reduction of sea turtle strandings caused by crude oil.

**Key words:** *Caretta caretta*, crude oil, loggerhead, Particularly Sensitive Sea Area, sea turtle.

The most common sea turtle species in the Canary Islands is the loggerhead turtle (*Caretta caretta*; Mateo et al., 1997). The population of loggerhead turtles in the Canary Islands is estimated to be several hundred, and large numbers can be seen on their migratory journey through the area (IMO, 2007). Juvenile loggerhead turtles around the coasts of the Canary Islands come from two migration routes: from the US Western Atlantic by the Gulf Stream (Pérez-Jiménez, 1997) and from Cape Verde (Monzón-Arquiello et al., 2009).

Causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands have been described (Orós et al., 2005, 2012). However, no studies on the impact of crude oil pollution on stranding of loggerheads in the Canary Islands have been

reported, to our knowledge. Because of their geostrategic location, there is extensive maritime activity in the waters of the Canary Islands, and a major problem lies with the intensive traffic of large oil tankers bound for the Persian Gulf. Approximately 1,500 vessels sail in ballast along the north/south route and are loaded along the south/north route. In both cases, there is uncontrolled spillage of oil residues (IMO, 2007). We report the number of strandings caused by crude oil among loggerhead turtles in the Canary Islands between 1998 and 2011, describe pathologic findings, and analyze the impact of the designation of the Canary Islands as a Particularly Sensitive Sea Area (PSSA) in 2005.

Between January 1998 and December 2011, 1,679 loggerhead turtles that stranded on the coasts of the Canary Islands (27°37'–29°25'N, 13°20'–18°10'W) were submitted to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center (TWRC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain, for health evaluation, medical management, and possible rehabilitation. The mean  $\pm$  standard deviation of the straight carapace length (SCL) and weight of the stranded turtles were  $36.17 \pm 11.09$  cm (range, 13–85.20 cm) and  $9.16 \pm 7.74$  kg (range, 0.26–55.50 kg), respectively. Based on SCL, all specimens, except one adult, were identified as juvenile and subadult (Bjorndal et al., 2001).

The causes of stranding were diagnosed using a complete protocol approved by the TWRC Animal Care Committee. This protocol included physical and neurologic examination; x-ray exploration; blood collection, hematologic, and biochemical

evaluation; endoscopy; skin and shell biopsies; microbiologic cultures; and sending of the dead turtles to the Veterinary Faculty at the University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) for necropsy and histopathology. Diagnosis of crude oil stranding was made when signs of ingestion of crude oil, occlusion of nares by crude oil, or presence of crude oil on more than 60% of the skin and carapace/plastron or on the eyes were observed in absence of other pathologic conditions.

Sea turtles were placed for rehabilitation individually in outdoor pools with continuous flow of marine water and were fed fresh or frozen fish once daily. Clinical evaluation, including physical examination, evaluation of swimming activity, core body temperature (measured from the cloaca), food ingestion, and weight, was performed daily following a complete clinical assessment protocol (Norton, 2005). Treatments included, when necessary, amputation of the injured flipper, surgical removal of fish hooks, force (tube) feeding, cleaning (using antiseptic solutions, such as chlorhexidine and povidone-iodine) and debriding of the external traumatic injuries, antimicrobial therapy, fluid support, correction of floating problems (lung injury, intestinal impaction), and mineral oil gavages. External oil was removed with detergent baths (Fairy, Procter and Gamble Spain, Madrid, Spain) and vegetable oil. Activated charcoal (Aditio, Panreac, Barcelona, Spain) was given orally (2–8 g/kg) if signs of crude oil ingestion were observed. Each turtle was released when it was determined to be convalescent, based on clinical parameters, and the turtle was in good physical condition. Gross postmortem examinations were carried out using the procedures previously described (Orós and Torrent, 2001). Samples of all major organs were fixed in 10% neutral-buffered formalin, routinely processed, embedded in paraffin, sectioned at 4  $\mu$ m, and stained with hematoxylin and eosin.

The causes of stranding were entanglement in fishing nets and plastic debris

TABLE 1. Numbers of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands (1998–2011) and numbers of strandings caused by crude oil.

Year	Total no. stranded turtles	No. turtles stranded by crude oil	%
1998	68	0	0
1999	131	8	6.1
2000	147	11	7.5
2001	197	12	6.1
2002	158	2	1.3
2003	186	4	2.2
2004	144	7	4.9
2005	106	0	0
2006	152	2	1.3
2007	107	3	2.8
2008	79	0	0
2009	84	0	0
2010	62	3	5
2011	58	0	0
Total	1,679	52	3.1

( $n=856$ ; 51.0%), ingestion of hooks and monofilament lines ( $n=212$ ; 12.6%), infectious diseases ( $n=116$ ; 6.9%), traumatic injuries caused by boat strikes ( $n=88$ ; 5.2%), crude oil ( $n=52$ ; 3.1%), buoyancy disorders ( $n=49$ ; 2.9%), debilitation ( $n=21$ ; 1.2%), plastic ingestion ( $n=18$ ; 1.1%), shark attack ( $n=6$ ; 0.4%), other causes ( $n=22$ ; 1.3%), and unidentified causes ( $n=239$ ; 14.1%).

Fifty-two juvenile loggerhead turtles stranded during the period of study because of crude oil (3.1%; Table 1). The mean  $\pm$  standard deviation of the SCL and weight of the turtles stranded by crude oil was  $30.06 \pm 7.54$  cm (range, 17–44 cm) and  $4.79 \pm 3.37$  kg (range, 0.77–13 kg), respectively. Signs of ingestion of crude oil (presence of crude oil in the mouth or esophagus; Fig. 1) were observed in 23 turtles (44%). Crude oil covering more than 60% of the skin and carapace/plastron in absence of other pathologic condition occurred in 29 turtles (56%). Of these 29 turtles, 10 (34%) had both eyes covered by crude oil, and 7 (24%) had occluded nares by crude oil. Histologically, mild-to-severe necrotizing dermatitis was diagnosed in all these turtles. Average rehabilitation time





FIGURE 1. Crude oil in the mouth of a juvenile loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) stranded due to crude oil in the Canary Islands, Spain.

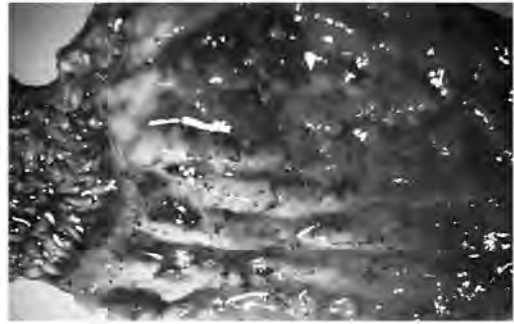


FIGURE 2. Necrotizing gastritis associated with the presence of small particles of crude oil in the stomach of a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain.

for turtles stranded by crude oil was 20 days (range, 1–94 days). Forty-six turtles (88%) stranded by crude oil survived after medical management in the TWRC. Three loggerheads (6%) died during the hospitalization; two (4%) were recovered dead in a good state of preservation. Turtles that died in the TWRC were anemic. Grossly, lesions included esophageal impaction with balls of crude oil ( $n=5$ ; 10%) and severe necrotizing gastritis ( $n=2$ ; 4%; Fig. 2). Histologically, lesions included severe necrotizing gastritis ( $n=2$ ; 4%), mild-to-severe necrotizing enteritis ( $n=3$ ; 6%), mild necrotizing hepatitis ( $n=3$ ; 6%), and mild tubulonephrosis ( $n=4$ ; 8%).

To compare statistically the number of strandings caused by crude oil in two periods (1998–2005 and 2006–11) Student's *t*-test and Fisher exact test were used to compare data sets using the program PASW Statistics 18.0 (formerly SPSS Inc., now IBM Corporation, Armonk, New York, USA). Statistical significance was set at  $P<0.05$ . Taking the study period as a reference (1998–2011), the number of strandings caused by crude oil after 2005 was significantly lower than it was before 2006 ( $P<0.05$  for both tests). Percentages of strandings because of crude oil versus overall strandings for both periods using the Fisher exact test were 3.87% and 1.48% respectively ( $P=0.007$ ).

Strandings caused by crude oil represented 3.1% of the sea turtle strandings in the Canary Islands. On a yearly basis, about 1% of strandings identified by the US sea turtle stranding network was associated with oil, with higher rates in South Florida (3%) and Texas beaches (3–6.3%; Lutcavage et al., 1996). The high survival rate (88%) of the turtles stranded by crude oil is remarkably high. Other stranding causes, particularly traumatic injuries caused by boat strikes, involved very low survival rates (Orós et al., 2005). Ingestion of crude oil and subsequent internal lesions threaten sea turtle survival, whereas lesions in the skin, carapace, and plastron are not fatal in most cases. Experiments on the physiologic and clinicopathologic effects of crude oil showed that major body systems in sea turtles may be adversely affected by short exposure to crude oil (Lutcavage et al., 1995). In a previous study on loggerhead turtles stranded in the Canary Islands, loggerheads stranded by crude oil ingestion had significantly lower red blood cell counts, and significantly higher white blood cell and thrombocyte counts than those observed in clinically normal turtles (Casal and Orós, 2009). Regarding the treatment, although some veterinary guides on medical care of sea turtles recommend the use of activated charcoal (Wyncken et al., 2006), that has a limited role in the

management of hydrocarbon ingestion because it poorly absorbs most hydrocarbons and may cause vomiting and aspiration (Shannon, 2000).

Our study shows that the designation of the Canary Islands as a PSSA in 2005 by the International Maritime Organization (IMO) was associated with a reduction of sea turtle strandings caused by crude oil. A PSSA is an area of the marine environment that needs special protection through action by the IMO because of its significance for recognized ecologic, socioeconomic, or scientific attributes, where such attributes may be vulnerable to damage by international shipping activities (IMO, 2007). International recognition of the waters of the Canary Islands as a PSSA was adopted in July 2005 and entailed the likely regulation and control of the intensive shipping in the region to prevent polluting spillages and, when necessary, to minimize the effects of accidental pollution. The associated protective measures were adopted in 2006 and included traffic separation systems (recommended routes), areas to be avoided, and mandatory ship reporting systems (IMO, 2007). Our study contributes to the information on the causes of stranding among sea turtles in the Canary Islands, with particular attention to the impact of crude oil.

This study was supported by the Project PI2007/044 (ACIISI, Gobierno de Canarias).

#### LITERATURE CITED

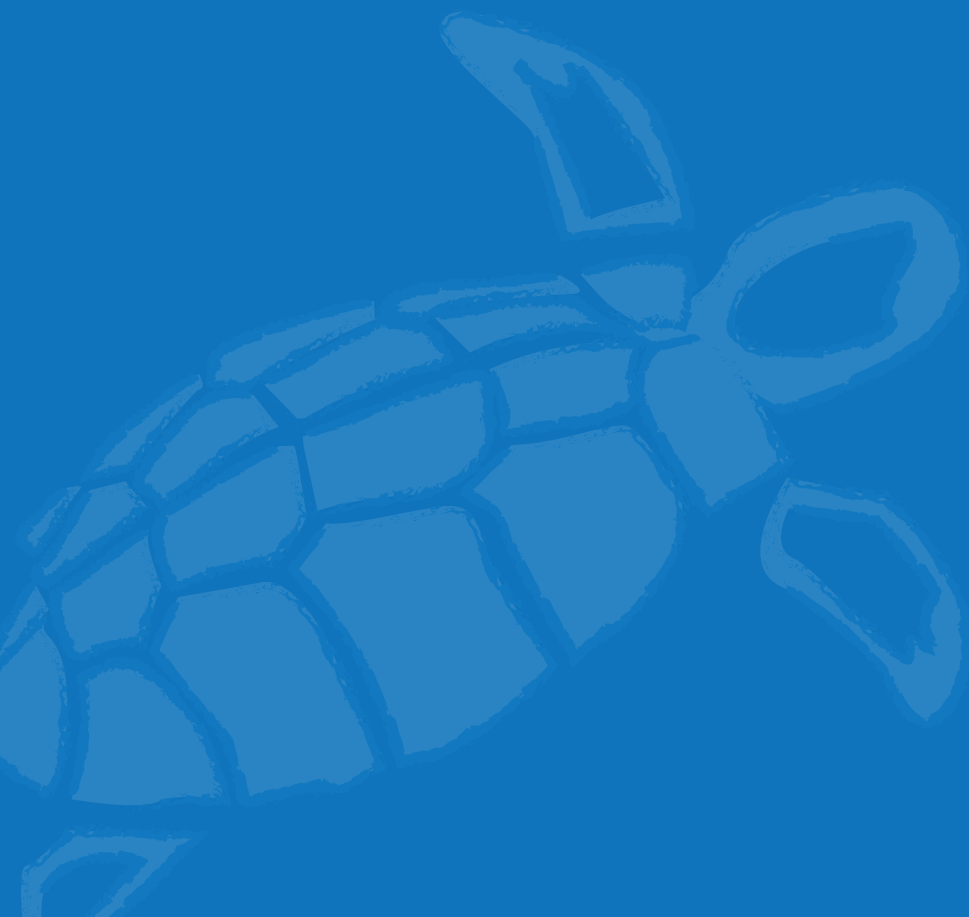
- Bjorndal KA, Bolten AB, Koike B, Schroeder BA, Shaver DJ, Teas WG, Witzell WN. 2001. Somatic growth function for immature loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, in southeastern U. S. waters. *Fish Bull* 99:240–246.
- Casal AB, Orós J. 2009. Plasma biochemistry and haematology values in juvenile loggerhead sea turtles undergoing rehabilitation. *Vet Rec* 164:663–665.
- International Maritime Organization (IMO). 2007. *PSSA particularly sensitive sea areas*. IMO Publication, London, UK. 144 pp.
- Lutcavage ME, Lutz PL, Bossart GD, Hudson DM. 1995. Physiologic and clinicopathologic effects of crude oil on loggerhead sea turtles. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:417–422.
- Lutcavage ME, Plotkin P, Witherington B, Lutz PL. 1996. Human impacts on sea turtle survival. In: *The biology of sea turtles*, Lutz PL, Musick JA, editors. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 387–409.
- Mateo JA, Andreu AC, López-Jurado LF. 1997. Las tortugas marinas de la Península Ibérica, Baleares, Azores, Madeira y Canarias: Introducción. In: *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*, Pleguezuelos JM, editor. Universidad de Granada Editorial, Granada, Spain, pp. 433–434.
- Monzón-Argüello C, Rico C, Carreras C, Calabuig P, Marco A, López-Jurado LF. 2009. Variation in spatial distribution of juvenile loggerhead turtles in the eastern Atlantic and western Mediterranean Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 373:79–86.
- Norton TM. 2005. Chelonian emergence and critical care. *Semin Avian Exotic Pet Med* 14:106–130.
- Orós J, Torrent A. 2001. *Manual de necropsia de tortugas marinas*. Ediciones del Cabildo de Gran Canaria, Las Palmas de G. C., Spain, 74 pp.
- Orós J, Torrent A, Calabuig P, Déniz S. 2005. Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998–2001). *Dis Aquat Org* 63:13–24.
- Orós J, Arencibia A, Monagas P. 2012. Anthropogenic causes of mortality of sea turtles in the Canary Islands: A multidisciplinary approach to the conservation of endangered sea turtles. In: *Turtles: Anatomy, ecology and conservation*, Cosgrove MJ, Roe SA, editor. Nova Science Publishers, Inc., New York, New York, pp. 53–86.
- Pérez-Jiménez A. 1997. *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). In: *Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal*, Pleguezuelos JM, editors. Universidad de Granada Editorial, Granada, Spain, pp. 435–437.
- Shannon M. 2000. Ingestion of toxic substances by children. *N Engl J Med* 342:186–191.
- Wyneken J, Mader DR, Scott Weber III E, Merigo C. 2006. Medical care of sea turtles. In: *Reptile medicine and surgery*, 2nd Ed., Mader MD, editor. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 972–1007.

Submitted for publication 26 March 2012.

Accepted 25 December 2012.

## ANEXO 2

Pansteatitis associated with high levels of polychlorinated biphenyls in a wild loggerhead sea turtle *Caretta caretta*



**ANEXO II**

**Pansteatitis associated with high levels of polychlorinated**

**biphenyls in a wild loggerhead sea turtle *Caretta caretta* .....289**

# Pansteatitis associated with high levels of polychlorinated biphenyls in a wild loggerhead sea turtle *Caretta caretta*

J. Orós<sup>1,\*</sup>, P. Monagas<sup>1</sup>, P. Calabuig<sup>2</sup>, O. P. Luzardo<sup>3</sup>, M. Camacho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Morphology, Veterinary Faculty, University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), 35416 Arucas (Las Palmas), Spain

<sup>2</sup>Tafira Wildlife Rehabilitation Center (Cabildo de Gran Canaria), Tafira Baja, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>3</sup>Toxicology Unit, Department of Clinical Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), PO Box 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

**ABSTRACT:** We describe the morphologic and toxicological findings in a case of pansteatitis in a stranded loggerhead sea turtle *Caretta caretta*. At necropsy, a large amount of adipose tissue in the celomic cavity showing very firm, yellow to orange irregular formations was observed. Histological lesions ranged from the infiltration of necrotic fat by scarce multinucleated giant cells and numerous macrophages containing xylene-insoluble lipopigment inclusions to the presence of several granulomas characterized by an irregular central necrotic area consisting of lipopigment surrounded by numerous multinucleated giant cells. Microbiological cultures were negative. Celomic fat was analyzed for PCBs and DDTs, resulting in very high levels of PCB 138, 153, 180 and 209 (3170, 2830, 980 and 1190 ng g<sup>-1</sup>, respectively). Although a nutritional cause cannot be ruled out, the high levels of PCBs detected in the celomic fat could have induced lipid peroxidation in adipocytes, resulting in cell damage, deposition of ceroid pigment and inflammatory response. This is the first report of pansteatitis in a wild sea turtle.

**KEY WORDS:** Contaminants · PCBs · DDTs · Disease · Lipid peroxidation

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

## INTRODUCTION

All species of sea turtles are included in the Red List of the World Conservation Union (IUCN 2012). In recent years, increased efforts have been devoted to the conservation of sea turtles, including medical management and pathological studies on stranded animals (Work et al. 2004, Orós et al. 2005). Although the most common species in the Canary Islands is the loggerhead turtle, evidence of a decline in the population of loggerheads in the Canary Islands has been reported (Blanco & González 1992).

Pansteatitis describes generalized inflammation of the subcutaneous and intra-abdominal fat, mainly

associated with vitamin E deficiency and with the same etiologies described for panniculitis (German et al. 2003). Among the class Reptilia, pansteatitis has only been described in captive American alligators *Alligator mississippiensis* (Larsen et al. 1983), farmed (Huchzermeyer 2003) and wild Nile crocodiles *Crocodylus niloticus* (Bouwman et al. 2009), and captive olive ridley sea turtles *Lepidochelys olivacea* (Manawatthana & Kasorndorkbua 2005).

Although there are numerous studies reporting baseline levels of contaminants in several species of sea turtles from different geographical areas, available data on the effects of these contaminants on diseases and lesions of sea turtles are scarce

\*Email: joros@dmor.ulpgc.es

(Keller et al. 2004b, Swarthout et al. 2010, Orós et al. 2012).

Since 1994, the Veterinary Faculty at the University of Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) has been carrying out a survey of lesions and causes of mortality among sea turtles stranded on the coasts of the Canary Islands. This paper describes morphologic and toxicological findings in a case of pansteatitis in a stranded loggerhead sea turtle *Caretta caretta*.

## MATERIALS AND METHODS

A subadult female loggerhead sea turtle was found in March 2009 floating off the coast of Gran Canaria, Canary Islands. The turtle weighed 19.2 kg and had a curved carapace of length and width 55.7 and 57.3 cm, respectively, and a straight carapace length of 54 cm and width of 52.1 cm. The turtle was lethargic, weak, and non-responsive to external stimuli, and was floating in a non-horizontal position, with a lifting of the cranial part of the carapace. The animal died before a health evaluation and medical management could be done at the Tafira Wildlife Rehabilitation Center (TWRC), and the carcass was submitted to the Veterinary Faculty, ULPGC, for post mortem examination.

Necropsy was carried out using the procedures previously described (Orós & Torrent 2001, Flint et al. 2009). Macroscopic lesions were recorded and tissue samples from all major organs were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5  $\mu$ m for light microscopy and stained with hematoxylin and eosin (HE). Periodic acid-Schiff (PAS) and Ziehl-Neelsen (ZN) stains were used to stain selected sections.

Celomic fat was collected during necropsy, wrapped in aluminium foil and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Polychlorinated biphenyls (IUPAC nos. 28, 31, 52, 101, 138, 153, 180, and 209) and DDT and its metabolites (OC-DDTs) (*o,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, and *o,p'*-DDD) were analyzed according to the method described by Tanabe et al. (1994). The validity of analytical methods was confirmed with Standard Reference Materials (CARP-2: ground whole carp *Cyprinus carpio*) obtained from the National Research Council of Canada (Table 1).

Aliquots (4 to 7 g) of the homogenized samples were ground with anhydrous sodium sulphate in a mortar, and extracted using Soxhlet apparatus for 6 h with 300 ml of diethyl ether:hexane (3:1) solvent mixture. Extracts were concentrated in volume to 10 ml

Table 1. Precision and accuracy of analytical methods obtained using a certified ground whole carp *Cyprinus carpio* (CARP-2). Concentrations are given in  $\text{ng g}^{-1}$  wet weight. Number of replicates: 3

	CARP-2	
	Certified	Found
PCB 28	34 $\pm$ 7.2	31.5 $\pm$ 2.6
PCB 52	138 $\pm$ 43	120.1 $\pm$ 11.1
PCB 101	145 $\pm$ 48	148.7 $\pm$ 18.3
PCB 138	103 $\pm$ 30	99.8 $\pm$ 16.8
PCB 153	105 $\pm$ 22	115.2 $\pm$ 14.8
PCB 180	53.3 $\pm$ 13.0	58.7 $\pm$ 9.5
PCB 209	4.6 $\pm$ 2.0	4.8 $\pm$ 3.8
<i>o,p'</i> -DDD	21.8 $\pm$ 0.7	18.6 $\pm$ 2.9
<i>o,p'</i> -DDE	2.9 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 3.4

in Kuderna-Danish and the aliquots (2 ml) were transferred to a glass column packed with 20 g of Florisil and dried by passing through nitrogen gas. Organochlorines adsorbed on Florisil were eluted with 150 ml of 20% hexane-washed water in acetonitrile and transferred to a separatory funnel containing 600 ml of hexane-washed water and 100 ml of hexane. After partitioning, the hexane layer was concentrated, cleaned up with sulphuric acid, and passed through a 12 g Florisil packed glass column for separation.

Final determination of PCBs and OC-DDTs was carried out using a Varian 3600 gas chromatograph fitted with an electron capture detector (GC-ECD). All analyses used a fused-silica capillary column Supelco (length 30 m, inside diameter 0.53 mm and film thickness 0.50  $\mu$ m). The column oven was programmed from 60 to 160 $^{\circ}\text{C}$ , held for 10 min, and then increased to 260 $^{\circ}\text{C}$  at a rate of 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  and held for 20 min. Injector and detector temperatures were set at 260 and 280 $^{\circ}\text{C}$  respectively. Nitrogen was used as carrier gas with 63.3  $\text{ml min}^{-1}$ . The internal standard used for quantification of OC-DDTs and PCB congeners was tetrachloro-*m*-xylene. Detectable concentration range for the contaminants included in this study was from 1  $\text{ng g}^{-1}$  (instrumental quantification limit) to 50 000  $\text{ng g}^{-1}$  (optimum linear limit). Concentrations of contaminants (means of 3 measurements) are presented as  $\text{ng g}^{-1}$  on a wet weight basis.

Samples from liver, celomic wall and celomic fat were also taken and cultured on a variety of selective and non-selective media including blood agar (Oxoid), MacConkey agar (Oxoid), Baird Parker agar (Oxoid) for staphylococci, and Sabouraud Dextrose agar (Oxoid) for fungi and yeasts. All cultures were incubated at 25 $^{\circ}\text{C}$  aerobically.

## RESULTS

At necropsy a generalized subcutaneous edema was observed. Large amount of adipose tissue in the celomic cavity showing very firm, yellow to orange irregular formations was observed (Fig. 1). At the cut surface the fat showed orange to brown irregular nodules and was mildly hyperhemic (Fig. 1). Fat samples did not float in the formalin solution. The liver was cranially displaced and presented a reduced size. Several nematode larvae were observed in the gastric serosa. No gross lesions were visible in other major organs.

Histologically, the celomic fat presented severe extensive degeneration and necrosis. Lesions ranged from the infiltration of necrotic fat by scarce multinucleated giant cells and numerous macrophages containing xylene-insoluble lipopigment inclusions to the presence of several granulomas characterized by an irregular central area consisting of necrotic fat showing variable amounts of lipopigment surrounded by numerous multinucleated giant cells (Fig. 2). In addition, granulomas consisting of varyingly enlarged as well as ruptured adipocytes surrounded by ceroid-containing macrophages were observed. Presence of ceroid pigment in the macrophages and in the areas of necrotic fat was confirmed by staining with ZN (Fig. 2, inset) and PAS stains. No microorganisms or parasites were identified in the lesions of the fat. Several granulomas associated a nematode larvae were observed in the lamina propria, submucosa, lamina muscularis and serosa of the stomach. No histological lesions were observed in other organs. All microbiological cultures were negative.



Fig. 1. *Caretta caretta*. Large amount of adipose tissue showing very firm irregular formations in the left part of the celomic cavity. Note the dark nodule (arrow) in the cut surface. Scale bar = 2.2 cm

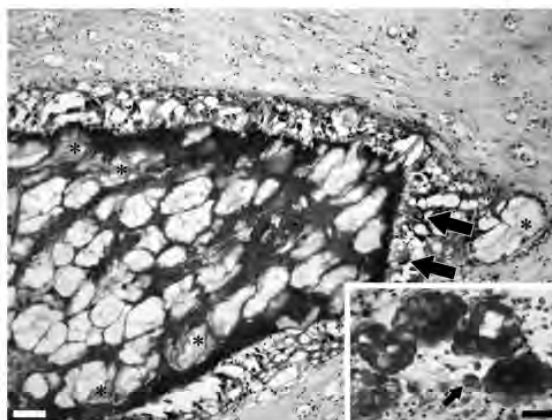


Fig. 2. *Caretta caretta*. Granuloma in the celomic fat characterized by a central area of fat necrosis with variable amounts of lipopigment (\*) surrounded by numerous multinucleated giant cells (arrows). HE stain. Scale bar = 80  $\mu\text{m}$ . Inset: Acid-fast staining of the ceroid pigment in areas of necrotic fat and within macrophages (arrow). ZN stain. Scale bar = 55  $\mu\text{m}$

Concentrations of PCBs and OC-DDTs in the celomic fat of this turtle are presented in Table 2.

## DISCUSSION

Histological examination of the celomic adipose tissue of this turtle confirmed the diagnosis of pansteatitis. The presence of ceroid-laden macrophages and characteristic multinucleated giant cells surrounding degenerating and ruptured adipocytes as well as the associated granuloma formation are typical findings in all reptile species suffering from

Table 2. *Caretta caretta*. Concentration of PCBs and OC-DDTs ( $\text{ng g}^{-1}$  wet wt) in the celomic fat of the loggerhead turtle suffering from pansteatitis. BDL: below detection limit ( $1 \text{ ng g}^{-1}$ )

	Contaminant	Concentration
PCB	28,31	5.1
	52	4.8
	101	7.8
	138	3170
	153	2830
	180	980
	209	1190
<i>o,p'</i> -DDT		6.3
<i>o,p'</i> -DDD		5.9
<i>o,p'</i> -DDE		BDL

pansteatitis (Larsen et al. 1983, Huchzermeyer 2003, Manawatthana & Kasorndorkbua 2005, Bouwman et al. 2009). In addition, similar lesions have been reported in several fish species (Begg et al. 2000, Goodwin 2006, Roberts & Agius 2008, Huchzermeyer et al. 2011). This is the first report of pansteatitis in a wild sea turtle.

In a study on the lipid properties of pansteatitis-affected wild Nile crocodiles the authors concluded that the hard texture of celomic fat with steatitis was not caused by the fatty acid composition, but could be ascribed to the mononuclear cellular infiltrate associated with the inflammatory process (Osthoﬀ et al. 2010). Buoyancy problems are common in sea turtles and are not always associated with pulmonary lesions (Orós et al. 2005). In the absence of pulmonary and intestinal lesions the large amount of very hard fat irregularly distributed mainly in the caudal part of the celomic cavity observed in this turtle could explain the abnormal floatation.

Pansteatitis has been defined as a nutritional disorder characterized by inflammation of adipose tissue and deposition of ceroid pigment in fat cells as a result of vitamin E deficiency (Osthoﬀ et al. 2010). Fytianou et al. (2006) provided experimental evidence linking the disease to the consumption of high levels of unsaturated fatty acids or oxidized fats that deplete the vitamin E.

Pansteatitis in reptiles has been previously associated with an exclusive fish diet in captive alligators (Larsen et al. 1983), consumption of large numbers of dead and rancid fish in farmed crocodiles (Huchzermeyer 2003), and exclusive frozen fish diet for more than 20 yr without proper vitamin supplementation in captive olive ridley sea turtles (Manawatthana & Kasorndorkbua 2005). In 2008 an episode of crocodile pansteatitis occurred in the Kruger National Park (KNP), South Africa. The primary cause of this outbreak remains unknown, but it is speculated that the deaths were triggered by a combination of environmental and dietary factors (Bouwman et al. 2009). Sediment from the rivers in the KNP contained traces of dioxin-like substances, some pesticides (DDT and HCH), polycyclic aromatic hydrocarbons, and polybrominated flame-retardants. However, the levels of organochlorine contaminants found in the fat of dead crocodiles were not particularly high, and none of their methylsulfone metabolites were detected (Bouwman et al. 2009). In addition, Begg et al. (2000) reported steatitis in 2 species of wild marine fish, with suspicion of a pollution-related etiology, and changes in antioxidant parameters in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* have been linked to the effects

of oxidative stress from polluted water (Bainy et al. 1996).

The high levels of PCB 138, 153, 180 209 found in the celomic fat of this loggerhead turtle are very remarkable. In a previous study on PCBs in 30 loggerhead turtles stranded in the Canary Islands, the mean concentrations in fat for PCB 138, 153, 180 209 were 83, 133, 217, and 15 ng g<sup>-1</sup>, respectively, and the highest individual concentrations in fat for PCB 138, 153, 180 209 were 370.5, 2600, 5006, and 218 ng g<sup>-1</sup>, respectively (Orós et al. 2009). Authors concluded that tissues from those turtles contained higher levels of PCBs than those reported in turtles from other geographical regions. The levels of PCB 138, 153 209 in the turtle from the current study are the highest PCB values reported for a sea turtle (D'Ilio et al. 2011). In addition, these values were similar to those reported for bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* stranded in the Canary Islands (Carballo et al. 2008), suggesting that this turtle was feeding on fish.

The concentrations of *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, and *o,p'*-DDD in the fat of this loggerhead turtle were lower than those reported previously in a survey on 23 loggerhead turtles stranded in the Canary Islands (Monagas et al. 2008). However, because of the specific research interest of our department in the *o,p'*-DDT as estrogenic environmental contaminant compared to synthetic estrogens, *p,p'*-isomers were not measured. And, according to the bibliography, *p,p'*-DDE is the pesticide present in the greatest concentrations in sea turtles due to its highly persistent nature (D'Ilio et al. 2011).

Sea turtle blood is also a suitable alternative to fatty tissues for measuring organochlorine contaminants because blood concentrations reasonably represent those observed in the paired fat samples (Keller et al. 2004a). Paired blood plasma samples would have been informative to clarify contaminant distribution, as deposition to and remobilization from fat stores could have been heavily impacted by pansteatitis.

PCBs are organic pollutants that persist and bioaccumulate in the environment. Studies on the effects of these contaminants on diseases and lesions of sea turtles are scarce (Keller et al. 2004b, Swarthout et al. 2010). Previous studies have shown that they increase oxidative stress in many model systems including mammals (Wells et al. 1997), birds (Jin et al. 2001) and fish (Otto & Moon 1996). In fact, changes in the oxidative status due to the exposure to contaminants, such as certain PCB congeners (e.g. non-ortho-substituted and mono-ortho-substituted congeners), leads to generation of reactive oxygen



species and this has been linked with the development of lipid peroxidation and immunotoxicity in aquatic organisms (Coteur et al. 2001, Shimizu et al. 2007). There is growing evidence that both mechanisms can be involved in the development of steatitis (Begg et al. 2000, Fromenty et al. 2004). Although a nutritional cause (i.e. consumption of an abnormal quantity of oily fish with a high concentration of unsaturated fatty acids) for the pansteatitis observed in this wild loggerhead turtle cannot be ruled out, the high levels of PCBs detected in the celomic fat could have induced lipid peroxidation in adipocytes of this animal, resulting in cell damage, deposition of ceroid pigment and inflammatory response. The cause of the high levels of PCBs in this turtle could be a diet of higher trophic level, lipid-rich prey. However, the major diet components for loggerhead turtles in this geographical area are epipelagic salps, gastropods, pelagic coelenterates (primarily siphonophores and to a lesser extent Scyphomedusae and Hydro-medusae), and barnacles (Van Nierop & den Hartog 1984). Because loggerhead turtles are primarily carnivorous opportunistic feeders, feeding of some loggerheads primarily on fisheries bycatch could not be discarded.

Because data of the effects of PCBs on diseases and lesions of sea turtles are scarce, this report, although based on a single individual, provides an important addition to the association between PCBs and disease in sea turtles, and suggests the need to investigate the role of these contaminants in the pathogenesis of pansteatitis in vertebrates.

**Acknowledgements.** The authors thank P. Castro, Department of Morphology, University of Las Palmas de Gran Canaria, for technical assistance.

#### LITERATURE CITED

- ▶ Bairy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat Toxicol* 34:151–162
- ▶ Begg GS, Bruno DW, McVicar AH (2000) The histopathology and ultrastructure of steatitis affecting common dab *Limanda limanda*. *Dis Aquat Org* 41:123–133
- Blanco JC, González JL (1992). Libro rojo de los vertebrados españoles. Colección Técnica ICONA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid
- Bouwman H, Nieuwoudt C, Pieters R, Quinn L and others (2009) The curious case of the dying crocodiles in the Kruger National Park, South Africa. In: Proc 12th EuCheMS Int Conf Chem Environ, 14–17 June 2009, Stockholm, p 14
- ▶ Carballo M, Arbelo M, Esperón F, Mendez M, de la Torre A, Muñoz MJ (2008) Organochlorine residues in the blubber and liver of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded in the Canary Islands, North Atlantic Ocean. *Environ Toxicol* 23:200–210
- ▶ Coteur G, Danis B, Fowler SW, Teyssié JL, Dubois Ph, Warnau M (2001) Effects of PCBs on reactive oxygen species (ROS) production by the immune cells of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Mar Pollut Bull* 42:667–672
- ▶ D'Illo S, Mattei D, Blasi MF, Alimonti A, Bogianni S (2011) The occurrence of chemical elements and POPs in loggerhead turtles (*Caretta caretta*): an overview. *Mar Pollut Bull* 62:1606–1615
- ▶ Flint M, Patterson-Kane JC, Limpus CJ, Work TM, Blair D, Mills PC (2009) Postmortem diagnostic investigation of disease in free-ranging marine turtle populations: a review of common pathologic findings and protocols. *J Vet Diagn Invest* 21:733–759
- ▶ Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D (2004) The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 30:121–138
- ▶ Fytianou A, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Koutinas CK (2006) Blood  $\alpha$ -tocopherol, selenium and glutathione peroxidase changes and adipose tissue fatty acid changes in kittens with experimental steatitis (yellow fat disease). *Biol Trace Elem Res* 112:131–143
- ▶ German AJ, Foster AP, Holden D, Hotston Moore A, Day MJ, Hall EJ (2003) Sterile nodular panniculitis and pansteatitis in three weimaraners. *J Small Anim Pract* 44:449–455
- ▶ Goodwin AE (2006) Steatitis, fin loss and skin ulcers of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), fingerlings fed salmonid diets. *J Fish Dis* 29:61–64
- Huchzermeyer FW (2003) Crocodiles: biology, husbandry and diseases. CABI Publishing, Wallingford
- ▶ Huchzermeyer KDA, Govender D, Pienaar DJ, Deacon AR (2011) Steatitis in wild sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), in the Olifants and Lower Letaba Rivers in the Kruger National Park, South Africa. *J Fish Dis* 34:489–498
- IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) (2012) 2012 IUCN red list of threatened species. [www.redlist.org](http://www.redlist.org)
- ▶ Jin X, Kennedy SW, Di Muccio T, Moon TW (2001) Role of oxidative stress and antioxidant defense in 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced toxicity and species-differential sensitivity in chicken and duck embryos. *Toxicol Appl Pharmacol* 172:241–248
- ▶ Keller JM, Kucklick JR, Harms CA, McClellan-Green PD (2004a) Organochlorine contaminants in sea turtles: correlations between whole blood and fat. *Environ Toxicol Chem* 23:726–738
- ▶ Keller JM, Kucklick JR, Stamper MA, Harms CA, McClellan-Green PD (2004b) Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environ Health Perspect* 112:1074–1079
- ▶ Larsen RE, Buergelt C, Cardeilhac PT, Jacobson ER (1983) Steatitis and fat necrosis in captive alligators. *J Am Vet Med Assoc* 183:1202–1204
- Manawatthana S, Kasornrorkbua C (2005) Steatitis and vitamin E deficiency in captive olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*). In: Arai N (ed) Proc 6th SEASTAR-2000 workshop, Bangkok, p 85–87
- ▶ Monagas P, Orós J, Araña J, González-Díaz OM (2008) Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Mar Pollut Bull* 56:1949–1952

- Orós J, Torrent A (2001) Manual de necropsia de tortugas marinas. Ediciones del Cabildo de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria
- Orós J, Torrent A, Calabuig P, Déniz S (2005) Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998–2001). *Dis Aquat Org* 63: 13–24
- Orós J, González-Díaz OM, Monagas P (2009) High levels of polychlorinated biphenyls in tissues of Atlantic turtles stranded in the Canary Islands, Spain. *Chemosphere* 74: 473–478
- Orós J, Arencibia A, Monagas P (2012) Anthropogenic causes of mortality on sea turtles in the Canary Islands: a multidisciplinary approach to the conservation of endangered sea turtles. In: Cosgrove MJ, Roe SA (eds) *Turtles: anatomy, ecology and conservation*. Nova Science Publishers, New York, NY, p 53–86
- Osthoff G, Hugo A, Bouwman H, Buss P, Govender D, Joubert CC, Swarts JC (2010) Comparison of the lipid properties of captive, healthy wild, and pansteatitis-affected wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Comp Biochem Physiol A* 155:64–69
- Otto DME, Moon TW (1996) Phase I and II enzymes and antioxidant responses in different tissues of brown bullheads from relatively polluted and non-polluted systems. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:141–147
- Roberts RJ, Agius C (2008) Pansteatitis in farmed northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L.), in the eastern Adriatic. *J Fish Dis* 31:83–88
- Shimizu K, Ogawa F, Thiele JJ, Bae S, Sato S (2007) Lipid peroxidation is enhanced in Yusho victims 35 years after accidental poisoning with polychlorinated biphenyls in Nagasaki, Japan. *J Appl Toxicol* 27:195–197
- Swarthout RF, Keller JM, Peden-Adams M, Landry AM, Fair PA, Kucklick JR (2010) Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the Gulf of Mexico. *Chemosphere* 78:731–741
- Tanabe S, Sung JK, Choi DY, Baba N, Kiyota M, Tatsukawa R (1994) Persistent organochlorine residues in northern fur seal from the Pacific coast of Japan since 1971. *Environ Pollut* 85:305–314
- Van Nierop MM, den Hartog JC (1984) A study on the gut contents of 5 juvenile loggerhead turtles, *Caretta caretta* (Linnaeus) (Reptilia, Cheloniidae), from the south-eastern part of the North Atlantic Ocean, with emphasis on coelenterate identification. *Zool Meded Leiden* 59:35–54
- Wells PG, Kim PM, Laposi RR, Nicol CJ, Parman T, Winn LM (1997) Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res* 396:65–78
- Work TM, Balazs GH, Rameyer RA, Morris RA (2004) Retrospective pathology survey of green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis in the Hawaiian Islands, 1993–2003. *Dis Aquat Org* 62:163–176

Editorial responsibility: Thomas Braunbeck, Heidelberg, Germany

Submitted: May 29, 2012; Accepted: October 30, 2012  
Proofs received from author(s): January 22, 2013

