



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE  
CORTISOL Y DE OTROS PARAMETROS BIOQUIMICOS  
EN LA SANGRE Y SALIVA DE DELFINES TURSIOPS  
TRUNCATUS EN CAUTIVERIO Y DURANTE EL PROCESO  
DE TRANSPORTACION.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

LUZ MARIA HERNANDEZ BALLESTEROS



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

25 9256



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: " DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CORTISOL Y DE OTROS PARAMETROS BIOQUIMICOS EN LA SANGRE Y SALIVA DE DELFINES Tursiops truncatus EN CAUTIVERIO Y DURANTE EL PROCESO DE TRANSPORTACION.

realizado por LUZ MARIA HERNANDEZ BALLESTEROS

con número de cuenta 8720885-6 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	DR. OMAR HERNANDEZ PEREZ	<i>Omar H. P.</i>
Propietario		
Propietario	DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA	<i>M. L. Fanjul</i>
Propietario	BIOL. YOLANDA PAEZ SERNA	<i>Y. P. Serna</i>
Suplente	BIOL. JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO	<i>J. A. Prieto</i>
Suplente	M.V.Z. CARLOS RAMON GODINEZ REYES	<i>C. R. Godínez</i>

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## DEDICATORIAS

A mis padres:

Por todo el apoyo, aliento y amor que me han brindado durante todas las etapas de mi vida y por esa forma tan especial de guiarme por este camino tan difícil que es la vida. Un gracias muy especial.

A mis abuelitos:

Por todo el amor y las palabras de aliento para seguir adelante en la vida. Gracias.

A toda la familia:

Tanto materna como paterna por esa calidez que siempre me han brindado a través de todos estos años de mi vida. Gracias.

A mi hermano, su esposa Vero y Lalito:

Por esos momentos inolvidables que hemos pasado. Gracias.

A Yolanda y Yosmar:

Por el cariño y el gran apoyo que me han brindado para seguir superándome en la vida y lograr cada una de las metas que me he propuesto. Gracias.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Omar Hernández P.  
En reconocimiento a sus conocimientos  
y a su acertada asesoría y dirección para  
la realización de esta tesis.

A mi jurado.  
Por sus sensatas y valiosas observaciones.

A la Q.F.B. Luz María Ballesteros N.  
En agradecimiento a su invaluable ayuda  
en el desarrollo de las técnicas utilizadas  
en esta tesis y por la orientación sobre el  
comportamiento científico en el laboratorio.

**Al Biol. Luis Medrano.**

**Con profundo agradecimiento por su valiosa ayuda y atinadas observaciones durante la realización de esta tesis.**

**A la Quim. Miriam Enriqueta Ruiz Albarrán.**

**Por su valiosa ayuda en el manejo del paquete para la determinación del Cortisol.**

**Al entrenador Ricardo Sánchez.**

**Por su valiosa ayuda y gran disposición para el manejo y la toma de las muestras durante el transporte de los delfines.**

**A la entrenadora Angeles de Alba Monte.**

**Por su gran ayuda y orientación en la toma de las muestras de saliva de los delfines dentro de los delfinarios.**

**A todo el equipo humano de Convimar, S. A. por la ayuda y facilidades brindadas para el manejo de los delfines durante la realización de esta tesis**

**Al laboratorio de Mamíferos Marinos de la Facultad de Ciencias de la UNAM por toda la información facilitada sobre los delfines.**

**Mi agradecimiento a las autoridades de Convimar, S.A. y en especial al Dr. José Luis Solorzano por todas las facilidades otorgadas tanto para el manejo de los delfines como para la toma de las muestras de saliva y sangre tanto en los delfinarios de la compañía como durante el proceso de transporte.**

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del I.M.S.S.**

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	ii
<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>1.- GENERALIDADES DE LOS DELFINES</b>	1
<b>2.- ESTRÉS</b>	3
2.1- Definición	3
2.2- Sistemas endocrinos relacionados con el estrés	3
2.3- Estudios en humanos y otros mamíferos no cetáceos	4
2.4- Estudios en cetáceos particularmente en el delfín <u>Tursiops truncatus</u>	5
2.5- Otros parámetros bioquímicos	6
<b>3.- TRANSPORTE DE DELFINES</b>	8
<b>4.- JUSTIFICACION</b>	9
<b>5.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	10
5.1- Hipótesis	10
5.2- Objetivos	10
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	10
Organismos estudiados	10
Condiciones estudiadas	11
Recolección de muestras	11
Determinaciones químicas	12
Cortisol	12
Proteínas	16
$\beta$ -glucuronidasa	18
Malondialdehído	18
Análisis estadístico	20
<b>RESULTADOS</b>	20
Delfines control	22
Delfines transportados	25
<b>DISCUSION.</b>	31
<b>CONCLUSIONES</b>	37
<b>BIBLIOGRAGIA</b>	39

## RESUMEN

Se ha definido al estrés como la respuesta no específica del organismo a cualquier demanda que se hace sobre él. Dentro de los mecanismos involucrados en la adaptación de un organismo al estrés, se encuentra la función de las glándulas suprarrenales las cuales secretan, además de otras hormonas, al cortisol, estas hormonas regulan el metabolismo y apoyan al organismo en el manejo del estrés. El cortisol representa el 95% de los glucocorticoides suprarrenales y los niveles sanguíneos y salivales de este compuesto se han usado ampliamente para valorar la función adrenocórtica en relación con el estrés.

En esta tesis hemos estudiado la relación que existe entre las condiciones del manejo de los delfines Tursiops truncatus cuando éstos se transportan de un delfinario a otro y los niveles sanguíneos de cortisol, de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y del melondialdehído (MDA). Debido a que los animales considerados como "normales" o controles no se pudieron sangrar, los niveles de cortisol y  $\beta$ -glucuronidasa sólo se midieron en la saliva. Con el objeto de saber si los niveles de estos compuestos tienen en los delfines un comportamiento diurno similar al observado en otras especies de mamíferos incluido el humano, las muestras de saliva se tomaron a tres horas diferentes del día (9:30, 13:30 y 17:30 horas) de lunes a viernes. Los resultados indican que la concentración de cortisol en la saliva mostró una variación diurna similar a la observada en el humano y otros mamíferos inferiores. Esta concentración disminuyó desde un valor de  $2.5 \pm 0.48$  ng / ml obtenido a las 9:30 hs hasta un valor de  $1.0 \pm 0.82$  ng / ml a las 17:30 horas, pasando por un valor intermedio de  $1.3 \pm 0.34$  ng / ml a las 13:30 horas. Los valores para la  $\beta$ -glucuronidasa (ng /mg prot / hora) mostraron un comportamiento similar al del cortisol con un pico a las 9:30 horas de  $54 \pm 6$  ng para después declinar a un valor de  $42 \pm 4$  ng a las 13:30 horas y llegar a un valor de  $24 \pm 5$  ng a las 17:30 horas.

En otros dos grupos de delfines, los cuales fueron transportados por períodos de 3 y 18 horas los resultados indican que los cambios de los tres parámetros medidos en el suero de los delfines (cortisol,  $\beta$ -glucuronidasa y MDA) que viajaron 3 horas fueron similares en ambos sexos ( Man-Withney  $p = 0.33$ ,  $p = 1.00$  y  $p = 0.20$  respectivamente); sin embargo cuando se mide el índice de estrés (F/I), éste parece ser mayor en los machos que en las hembras (2.5 vs 1.8). Valores semejantes se encontraron en la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (2.7 vs 2.2). Cuando se analizan los resultados obtenidos después de 3 y 18 horas

de transporte sin considerar el sexo, observamos que a las 3 horas de transporte existe un aumento significativo (Kruskal-Wallis  $p < 0.05$ ) en la concentración de cortisol sanguíneo al final del proceso, cuando se compara con el valor observado al inicio ( $32 \pm 3$  vs  $68 \pm 18$  ng / ml). Este mismo comportamiento se observa para la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa ( $0.47 \pm 0.06$  vs  $1.09 \pm 0.15$  ng/mg prot/hora). Curiosamente los valores de ambos parámetros (cortisol y  $\beta$ -glucuronidasa) al inicio y al final del transporte de 18 horas fueron similares incluso la concentración de cortisol al final del transporte sufrió un pequeño descenso.

Los resultados relacionados con la determinación sérica del malondialdehído (MDA) durante el transporte de 3 y 18 horas muestran que los valores son más altos al final (F) que al inicio (I) del experimento en ambos grupos de animales ( $66 \pm 14$  vs  $91 \pm 16$  y  $88.5 \pm 5.5$  vs  $108.5 \pm 2.5$  nmolas/mg prot) respectivamente. Los valores de malondialdehído en los delfines que viajaron durante 18 horas son más altos en ambos tiempos, sin embargo la capacidad de respuesta F / I es mayor en los delfines que viajaron 3 horas (1.4 vs 1.2).

Los resultados presentados en esta tesis parecen indicar que los animales que viajan se estresan desde el inicio del transporte ya que los valores de cortisol en este momento son más altos que los valores para cortisol encontrados por otros autores tanto en delfines como en otros animales silvestres que se consideran valores "control" o en "reposo". Aunque son muy pocas las determinaciones que se pudieron realizar durante la fase experimental dichos resultados podrían indicar que los delfines que viajaron por 3 horas se estresan más que los delfines que viajaron 18 horas, probablemente a consecuencia de una adaptación al transporte o al proceso normal circadiano.

# INTRODUCCION

## 1.- GENERALIDADES DE LOS DELFINES.

Dentro del grupo de los animales que forman la clase llamada mamíferos, las ballenas, los delfines y las marsopas constituyen el orden de los cetáceos. Los cetáceos actuales se dividen en dos subórdenes: los misticetos o cetáceos con ballenas y los odontocetos o cetáceos con dientes; cada uno de los cuales se divide a su vez en varias familias. Dentro del suborden de los odontocetos se encuentra la familia de los delfínidos o delfines. Los delfines son mamíferos cuyo hábitat es el mar, por lo que junto con las ballenas y marsopas se les ha denominado mamíferos marinos. Son animales de sangre caliente, respiran aire, nacen vivíparamente y nutren a sus crías con leche al igual que los humanos (1).

El delfín nariz de botella cuyo nombre científico es Tursiops truncatus es quizá el delfín más conocido y el mejor estudiado a causa de la facilidad con que se adapta al cautiverio, también es el mayor de los delfines con hocico diferenciado, llegando a medir cuando es adulto hasta 4 m con un peso de 650 Kg (1).

Tanto machos como hembras alcanzan la madurez sexual entre los 5 y 12 años de edad (variable). El ciclo reproductor de la mayor parte de las hembras dura dos o tres años. Se alimentan de pequeños peces, congrios, mújoles, calamares y camarones (1).

El delfín nariz de botella es tanto costero como pelágico. Esta especie de delfín está ampliamente distribuida desde las aguas frías y templadas hasta las aguas tropicales de todos los mares del mundo. Las poblaciones costeras se encuentran en aguas poco profundas (30 m de profundidad) y en diversos hábitats como las costas abiertas con fuerte oleaje hasta bahías resguardadas, canales y grandes estuarios. Aunque es poco conocida la distribución pelágica o en mar abierto, algunas poblaciones aparentemente se encuentran a lo largo del borde de la plataforma continental (2).

Estos delfines se pueden agrupar en manadas de tamaño variado, que van de 2 a 100 individuos en aguas costeras hasta cientos o miles de individuos en aguas profundas. También presentan grupos residentes cuyo tamaño y composición varían estacional o diúrnamente en respuesta a uno o más factores producidos en su hábitat (2). La interacción de estos delfines con el hombre es de gran

importancia, ya que en algunos lugares sirven como alimento, en otros son indicadores de la presencia de cardúmenes de peces de importancia comercial pero al mismo tiempo es un competidor para el hombre (2).

A principios de este siglo es cuando los delfines comienzan a tener importancia con fines recreativos dentro de los delfinarios y hasta hace pocos años con fines científicos(2).

La práctica de mantener a los animales silvestres en cautiverio con fines de domesticación es casi tan vieja como la historia misma. Los humanos empezaron a retener perros (relacionados con los lobos y los coyotes) y gatos (relacionados en los leones y los leopardos) como mascotas y eventualmente aprendieron a controlar su reproducción y a establecer las diferentes razas actuales (3). Sin embargo los mamíferos marinos nunca se han podido domesticar, aunque ya se han dado algunos pasos con este fin (3). El estudio de los delfines en cautiverio ha proporcionado los conocimientos suficientes para el control adecuado de la calidad del agua de los delfinarios. Se ha aprendido que la piel de los cetáceos está constituida de células vivas con núcleo por lo que una inmersión prolongada en agua con salinidad inferior al 1% causa necrosis y ulceraciones (2).

En el caso de algunas especies de animales comúnmente cautivos, los programas de reproducción proporcionan ahora animales de exhibición; sin embargo, la mayoría de los cetáceos en cautiverio en los últimos 50 años se han capturados directamente de la naturaleza, aunque existen datos de que ya en 1983 el 32% de los delfines cautivos en los Estados Unidos habían nacido en delfinarios. A veces son animales que han encallado, pero generalmente han sido animales libres, los cuales normalmente son capturados por red, ya sea individualmente con una red con aros sostenida de la proa de una embarcación perseguidora o como grupo con una red de pesca tipo de arrastre (3).

Una vez capturados, los animales son revisados, normalmente, por un veterinario para asegurarse de que gozan de buena salud antes de ser colocados en una camilla para ser transportados a las instalaciones de destino. Durante el transporte es vital que el delfín se mantenga frío y calmado, su piel debe mojarse frecuentemente o cubrirse con una toalla húmeda para evitar que su piel se reseque y por lo tanto que se agriete (4). Al llegar a los delfinarios de destino se debe permitir la aclimatación lenta del delfín en un ambiente solitario lejos del público y debe de observarse su salud. Puede ser que se requiera la administración de antibióticos y algunas otras medicinas durante este periodo para contrarrestar cualquier posible enfermedad (3).

Desafortunadamente, el estrés que causa la captura, el transporte y el cautiverio inicial a menudo resulta con la muerte del animal durante los primeros días o semanas, así que este es un período muy crítico. Si todo funciona bien y el animal empieza a aclimatarse a su nuevo hábitat y a una dieta a base de peces muertos, entonces debe introducirse lentamente a la observación humana, antes de enfrentarse a la experiencia del entrenamiento y al contacto al aire libre con el público general (2).

## **2.- ESTRES.**

### **2.1.- Definición.**

Se ha definido al estrés como la respuesta no específica del organismo a cualquier demanda que se hace sobre él (5). Esta demanda puede ser un trauma severo, como una quemadura, una enfermedad, cirugía mayor, hipoglucemia, fiebre, hipertensión, ejercicio, parasitismo, captura, cautiverio, transportación y muchas otras situaciones. (6).

La definición anterior involucra un síndrome de Adaptación General el cual se puede dividir en 3 fases:

1- Fase de Alarma, caracterizada por una respuesta fisiológica rápida en la cual se estimula el eje hipotálamo - hipófisis - adrenales (HHA). 2.- Fase de Compensación o Adaptación, donde después de una exposición más o menos prolongada al agente estresante el organismo se adapta a o compensa las condiciones alteradas que causan el estrés. Si el estrés es de suficiente intensidad y duración, la compensación puede no ser posible y el organismo entra a la tercera y última fase, o sea la etapa de mala adaptación o agotamiento del eje HHA (5).

### **2.2.- Sistemas endocrinos relacionados con el estrés**

Dentro de las glándulas endócrinas se encuentran las suprarrenales, las cuales son pequeñas masas de tejido amarillo, que se localizan en los extremos superiores de los riñones. Poseen una parte central, llamada médula suprarrenal y una porción externa denominada corteza suprarrenal. Aunque unidas anatómicamente, derivan de tipos diferentes de tejidos embrionarios y funcionan como glándulas distintas. Secretan hormonas que regulan el metabolismo y apoyan al organismo en el manejo del estrés. Todas las hormonas de la corteza suprarrenal son esteroides sintetizados a partir del colesterol. La corteza suprarrenal produce en cantidades significativas sólo tres tipos de hormonas: 1.- Andrógenos, 2.- Mineralocorticoides y 3.- Glucocorticoides. Dentro de los

glucocorticoides se encuentra el cortisol y este compuesto es el que nos interesa, fundamentalmente por ser la hormona que de manera más importante facilita la adaptación del organismo al estrés (7).

El Cortisol, también llamado hidrocortisona (4-pregnen-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-3,20-diona) representa alrededor del 95 % de los glucocorticoides suprarrenales y ayuda a asegurar el suministro adecuado de combustibles para las células cuando el organismo está en estrés. Induce en las células hepáticas la gluconeogénesis o sea la producción de glucosa a partir de otros nutrientes estimulando el transporte de aminoácidos hacia los hepatocitos. Promueve la movilización de grasas, para que haya ácidos grasos disponibles para su conversión a glucosa. De este modo, la corteza suprarrenal asegura el suministro de glucosa cuando el organismo está en estrés y que por consiguiente requiere más energía que en condiciones normales (8).

La estimulación del eje HHA se inicia en el cerebro en donde una situación de estrés se detecta en el sistema nervioso central (SNC) el cual envía una señal al sistema límbico (hipocampo) y éste a su vez envía una señal al hipotálamo; el cual como respuesta, secreta la hormona liberadora de corticotropina (HLC). Esta HLC se une a un receptor membranal presente en las células de la hipófisis y promueve la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). La ACTH se une a las células de la zona fasciculata de la corteza adrenal y aumenta la velocidad de síntesis del cortisol así como su secreción. El cortisol circula en la sangre unido a la transcortina o globulina fijadora de corticoesteroides (CBG en Inglés) con una disociación limitada hacia la forma libre. El cortisol libre es captado por muchas células del cuerpo que contienen cantidades variables de receptor a corticoesteroides. Una vez formado el complejo cortisol-receptor se transloca al núcleo celular en donde se une al ADN y promueve la síntesis de los productos fenotípicos necesarios para acelerar el metabolismo celular. Este proceso representa la acción celular de la hormona para inducir la adaptación al estrés (8).

### **2.3- Estudios en humanos y otros mamíferos, no cetáceos.**

Se ha observado que cuando los humanos son sometidos a diferentes situaciones de estrés ya sea de origen doloroso o de ansiedad presentan una elevación concomitante de los niveles de cortisol. Los incrementos variaron desde un 157% hasta un 230% dependiendo del tipo de estrés. Durante ciertos padecimientos como el síndrome de Cushing, los niveles de cortisol fueron del 380% más elevados que en personas sanas. Similarmente el tratamiento con 25 U.I. de ACTH elevó el cortisol en un 690%

comparado con el control. Además en personas normales se ha demostrado que existe un ritmo circadiano bien definido (6).

En la actualidad existe evidencia cada vez mayor de que por lo menos en el humano la medición de la concentración de cortisol en saliva es útil clínicamente como un índice del cortisol libre (no unido a proteína) circulante en el plasma sanguíneo (9, 10). Se ha demostrado también que la obtención de saliva es menos traumática que la obtención de sangre, por lo tanto se piensa que la medición de cortisol en saliva proporciona un índice mejor de la función adrenal que en el caso de la medición de cortisol en sangre (11, 12). Puesto que la colecta de saliva no produce estrés (al menos en humanos) (10) podría, por lo tanto, ser una técnica adecuada con el objeto de valorar los niveles de cortisol en situaciones de estrés en otros mamíferos entre ellos los delfines.

Cuando los adultos de algunos mamíferos, como en el caso del mono ardilla, se separan de sus compañeros del mismo sexo, muestran elevaciones desusadamente grandes de cortisol plasmático (13). Ocho días después de separarse del grupo, el cortisol en el plasma de las hembras del mono ardilla enjauladas individualmente aumentó entre el 18% y el 20% en relación a los niveles observados en hembras enjauladas por parejas (13). Estos resultados sugieren que durante el desarrollo postnatal, la compañía de miembros del mismo sexo tiene una influencia reguladora de la actividad Hipófisis-Adrenales, por lo menos en el mono ardilla (14-17). Alteraciones similares en la actividad Hipófisis-Adrenales se han observado en algunos desórdenes afectivos en el humano (6,18).

#### **2.4.- Estudios en cetáceos particularmente en el delfín tursiops truncatus .**

Los primeros estudios de sistema endocrino en los cetáceos fue la descripción de las glándulas endocrinas de las ballenas obtenidas de la industria ballenera, así como las de los animales muertos por varamientos (19).

La glándula adrenal en los mamíferos marinos anatómicamente es similar a la de los mamíferos terrestres con la corteza rodeando a la médula. Sin embargo, en los cetáceos dichas glándulas son pseudolobuladas debido a la presencia de tabiques de tejido de la médula adrenal y de tejido conjuntivo extendiéndose sobre la corteza adrenal (19).

El seguimiento hormonal de la función adrenal es relativamente nuevo en los mamíferos marinos. Los primeros niveles de cortisol que se reportaron fueron en la foca gris (Halichoerus grypus) y foca manchada o harpa (Pagophilus groenlandicus) y foca weddell (Leptonychotes weddelli) en vida libre

(19), y en cautiverio han sido reportados en la foca manchada o harpà, en el delfín nariz de botella (Tursiops truncatus) y en la Beluga (Delphinapterus leucas) (19).

En términos generales se considera que los valores normales de cortisol para los delfines nariz de botella podrían estar comprendidos entre los 11 y 47 ng/ml. Estos valores se obtuvieron en delfines tanto recién capturados, como con bastante tiempo en cautiverio. Dichos animales presentaron un incremento en los niveles de cortisol como respuesta a la captura y al confinamiento al que fueron sometidos y cuyos valores se encontraron entre los 200 y 300 ng/ml (19).

La sensibilidad de los métodos de radioinmunoensayo (RIA) para muestras de mamíferos marinos aun no se ha establecido claramente, sin embargo, los niveles de cortisol para la foca de Weddell (Leptonychotes weddelli) fueron 10 veces mayor que para cualquier otro mamífero marino, sugiriendo que los niveles de cortisol se encontraban realmente elevados antes del sangrado (19).

La evidencia de que el incremento en los niveles de cortisol refleja una respuesta a un estrés agudo se ha deducido de los cambios observados en las células sanguíneas. En la mayoría de los mamíferos, la exposición a niveles altos de glucocorticoides induce tanto una eosinopenia como una linfopenia transitoria(5, 19). En los delfines nariz de botella se encontró que cuando éstos se sacaban del agua, el número de eosinófilos estaba disminuido durante las primeras 7 horas fuera del agua (20). Medway y Geraci (21) observaron neutrofilia y eosinopenia en delfines estresados pero no observaron linfopenia. En contraste la administración de ACTH a delfines en cautiverio indujo eosinopenia y linfopenia, pero no neutrofilia (21).

Por otro lado Thompson y Geraci han observado que la proporción de cortisona a cortisol es de 1:5 en los delfines de nariz de botella y además han encontrado proporciones que van de 1:5 a 1:10 en animales con un largo tiempo en cautiverio (20).

### **2.5.- Otros parámetros bioquímicos.**

Como se mencionó anteriormente, el cortisol representa alrededor del 95 % de la actividad de los glucocorticoides de la corteza suprarrenal; cuya función principal es proporcionar suministros adecuados de combustible para las células cuando el organismo se encuentra en estrés, así como promover la movilización de grasas de manera que haya ácidos grasos para su conversión a glucosa. Los glucocorticoides reducen la inflamación en reacciones alérgicas, infecciones, artritis y algunos tipos de cáncer. Los glucocorticoides estabilizan las membranas de los lisosomas de manera que sus enzimas no destruyan los tejidos, también atenúan la inflamación reduciendo la permeabilidad de las

membranas capilares. Aminoran los efectos de la histamina y a largo plazo pueden tener efectos colaterales notorios, reduciendo la cantidad de linfocitos en el organismo con lo cual se disminuye la capacidad de los seres para combatir las infecciones (7).

Por otro lado existen en la literatura varios trabajos los cuales han demostrado, en el humano, una correlación entre la composición química de la saliva y el estado hormonal del organismo (22). Algunos de estos estudios han mostrado patrones característicos en el comportamiento de los componentes salivales como son: la glucosa (23), el sodio (24), el ácido siálico (25), y algunas actividades enzimáticas entre ellas las lisosomales (26) en relación con los niveles hormonales que inducen ovulación. Estos cambios se han correlacionado con el estado endócrino de la mujer y, en algunos casos, cambios similares se han inducido por la administración exógena de algunas hormonas.

Recientemente, también se ha demostrado que el estrés emocional esta acompañado por una activación de los procesos fisiológicos mediados por radicales libres, particularmente la peroxidación de lípidos (27-29). Además el grupo de Mori y cols han mostrado que el estrés emocional puede inducir la formación de especies de oxígeno reactivas que dañan las defensas antioxidantes y que finalmente llevan a un daño oxidativo (28, 30).

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (lípidos) involucra muchas reacciones complejas; produciéndose entre otros compuestos el malondialdehído (MDA). El MDA se produce principalmente por la peroxidación de ácidos grasos con más de tres dobles ligaduras separadas por un metileno; por lo tanto se origina del ácido araquidónico y del ácido docosaexanoico. Muy poco malondialdehído se forma de hidroperóxidos de los ácidos oleico, linoléico y linolénico. Se puede producir enzimáticamente de prostaglandinas y de espermina. Los valores de MDA en la orina de humanos normales estan entre 0.2 y 0.8  $\mu\text{M}$ . Otros productos de la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados son los llamados 4-hidroxi-alquilinos (31).

El método más usual para medir la concentración de los productos derivados de la lipoperoxidación está basado sobre la reacción del malonaldehído con dos moléculas del ácido tiobarbitúrico a un pH ácido para formar un derivado de color rosado cuya absorción máxima está a 532 nm con un coeficiente de extinción molar de 153,000 y el cual se extrae de la mezcla de reacción con butanol (32). Puesto que muchos otros aldehídos interaccionan con el ácido tiobarbitúrico entonces la reacción

con los productos de la peroxidación de lípidos se refiere como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS en inglés).

### **3.- TRANSPORTE DE DELFINES**

El transporte de mamíferos marinos comenzó en los años 20 (4) y ha ido presentando modificaciones hasta la fecha. Actualmente en México el transporte se realiza de la siguiente forma:

Después de acorralar al delfín a una zona del delfinario de poca profundidad se saca al animal del agua con una grúa y una camilla con agujeros al nivel de las aletas pectorales, ojos y parte genital, aunque en algunos delfinarios se saca al animal con una red para posteriormente colocarlo en la camilla.

Dicha camilla se coloca en una caja contenedora para evitar que el animal se mueva y se lastime. A continuación se le aplica a los delfines una capa de vaselina o lanolina, (en México se acostumbra sustituir estas sustancias por pomada capent) en todo su cuerpo para evitar que se le seque la piel y el animal se deshidrate. Una vez realizado esto, a la caja contenedora se le agrega agua y hielo para mantener al animal frío durante el transporte. La temperatura del agua recomendable para el transporte de pequeños cetáceos (delfines) es de 12 a 15 ° C (4).

Posteriormente la caja contenedora se coloca en la caja o remolque del camión en el cual va a ser transportado el cetáceo, generalmente se trata de que el remolque vaya cerrado para poder controlar con mayor facilidad la temperatura del cuerpo del animal; en caso de que el remolque no pueda ir cerrado, entonces se tratará de viajar de noche o en días nublados para lograr dicho fin (4).

Algo que es obligatorio para todo transporte es el hecho de que el animal se debe de someter a un periodo de ayuno, de preferencia de 12 a 24 horas antes de realizarse el movimiento para evitar que se presenten problemas gastrointestinales y vómito; además debe dárseles un gel para cubrir su estomago y evitar la posibilidad de una úlcera (4).

Una vez que el delfín ha llegado a su destino, la caja contenedora se baja del remolque y se lleva hasta la alberca en la cual va a ser confinado dicho cetáceo, de preferencia teniendo contacto con otros cetáceos presentes en dicha alberca para que el animal comience a adaptarse a su nuevo hogar.

#### 4.- JUSTIFICACIÓN

La homeostasis, definida como la tendencia de los organismos a mantener el ambiente interno relativamente constante, se encuentra regulada por varias hormonas y se mantiene en equilibrio gracias a los cambios que ocurren en el metabolismo celular; permitiendo de esta manera la adaptación del organismo al estrés.

Existe una buena evidencia de que el aumento de los niveles tanto sanguíneos como salivales del cortisol en algunos mamíferos incluido el humano reflejan una respuesta a un estado de estrés ((6,14-18).

La importancia de realizar una investigación que permita adaptar dichos hallazgos a los mamíferos marinos es evidente ya que en la actualidad es necesario tener una medida cuantitativa confiable y reproducible de los efectos de diversos factores causantes del estrés, entre los cuales se encuentran el cautiverio y la transportación, sobre la regulación del metabolismo (5). El seguimiento hormonal de la función adrenal, la cual esta relacionada con el manejo del estrés, es relativamente nuevo en los mamíferos marinos. Así los primeros valores sobre los niveles de cortisol, como ya se mencionó, se han realizado durante vida libre en la foca manchada y en la foca grise y en cautiverio se han estudiado en la foca manchada , en el delfín de nariz de botella así como en la beluga (19).

Por otro lado se sabe que cambios en los niveles de glucocorticoides pueden modificar la estabilidad membranar de los lisosomas aumentándola o disminuyéndola en diferentes casos (32, 34). Se ha demostrado también la existencia de una relación entre la composición química de la saliva, y en particular de algunas enzimas lisosomales, y el estado hormonal del organismo (22). Además el cortisol parece poseer un efecto directo favorecedor de la oxidación de los ácidos grasos en las células (8).

Recientemente, también, se ha observado que el estrés emocional se acompaña por una activación de la peroxidación de lípidos. Este proceso puede dañar las membranas celulares e interferir con la actividad de algunas enzimas asociadas a membrana (33-35).

Aunque Medway y cols (21) han determinado los niveles sanguíneos de cortisol en Tursiops truncatus bajo algunas condiciones de estrés, hasta la fecha los estudios de correlación de los niveles de cortisol en situaciones de estrés como son la captura, la transportación y el cautiverio, son muy escasos en México. Recientemente Schroeder y cols. (36), en un experimento diseñado para simular condiciones de transporte de delfines de nariz de botella encontraron que los niveles sanguíneos de

cortisol aumentaron en las primeras 9 horas del experimento, sin embargo hasta la fecha no parece existir evidencia alguna de cambios en los niveles de cortisol tanto en suero como en saliva durante un proceso de transportación verdadero.

La correlación de los cambios de los niveles de cortisol con los subsecuentes cambios en otros parámetros bioquímicos podría proporcionar información útil para esclarecer un poco más los mecanismos a través de los cuales los delfines manejan el estrés.

Puesto que hasta la fecha no se ha estudiado la correlación entre el grado de estrés producido por el transporte de los tursiones en cautiverio y los niveles de cortisol, enzimas lisosomales y peroxidación de lípidos tanto en suero sanguíneo como en saliva de los delfines nariz de botella con los procesos de transporte y tiempo de cautiverio. Se consideró importante medir los niveles de estos parámetros como un índice del grado de estrés, producido por la transportación, de los delfines.

## **5.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **5.1.- Hipótesis.**

El proceso de transporte produce en los delfines un estado de estrés el cual modifica los niveles de cortisol,  $\beta$ -glucuronidasa y malondialdehído del suero sanguíneo y de la saliva.

### **5.2.- Objetivos.**

- 1) Probar que el método para medir cortisol tanto en la saliva como en el suero de humanos se puede aplicar a los delfines (Tursiops truncatus).
- 2) Medir los niveles basales de cortisol en la saliva de los delfines Tursiops truncatus a diferentes horas durante el transcurso del día.
- 3) Medir los niveles de cortisol, de enzimas lisosomales y de malondialdehído en el suero de los delfines durante un proceso de transportación corto (3 horas) y un proceso de larga duración (18 horas).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Organismos estudiados.**

Se usaron seis delfines, (3 hembras y 4 machos) adultos, la mayoría de los cuales tenía un peso aproximado de 400 kg y una longitud de 2.0 –2.5 m y con edades de cautiverio que van de 1.2 a 10

años; durante los cuales ellos fueron manejados frecuentemente para actividades de entrenamiento con fines de espectáculo. Los delfines se mantuvieron en un estanque con agua a una temperatura entre 29° y 33 C y una salinidad de 35 ppm. Cada delfín se alimentó con una dieta de pescado en promedio de 8 a 10 kilos diarios. Antes del transporte los animales se sometieron a un ayuno previo de 12 a 14 horas.

### **Condiciones estudiadas.**

a).- En delfinarios.

Se estudiaron dos delfines con 10 años de cautiverio, los cuales generalmente estaban en un proceso de 2 a 3 entrenamientos y/o espectáculos de exhibición diarios de 30 minutos cada uno. Los delfines se alimentaron fundamentalmente con sierra, sardina y macarela congeladas. Al agua del estanque donde se encontraban estos delfines se le adicionó cloro, cada 12 horas para su limpieza.

b).- Durante el transporte.

Con el fin de capturar a los animales para su transportación, los delfines se acorralaron hacia una zona del delfinario de poca profundidad por medio una red con la cual finalmente los animales se inmovilizaron para posteriormente sacarlos del agua y colocarlos en una camilla con las características necesarias para no dañar las aletas pectorales, así como sus órganos genitales y se cubrieron con una capa de pomada "capent" o vaselina para evitar la deshidratación. Es necesario hacer hincapié que esta mecánica se realizó por separado para cada animal. Las camillas fueron colocadas en una caja contenedora con la cantidad suficiente de agua con hielo para poder ir hidratando a los animales todo el tiempo que duró el viaje.

### **Recolección de muestras.**

Dadas las condiciones que nos fijo el delfinario en el que se encontraban los animales control a un delfín macho y a un delfín hembra se les tomaron muestras de saliva de lunes a viernes a las 9:30, 13:30 y 17:30 horas para medir los niveles "basales" de cortisol, y los de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Los otros cinco delfines se sometieron a un proceso de transportación terrestre y las muestras tanto de saliva como de sangre se colectaron de acuerdo al siguiente plan de muestreo: La primera muestra se tomó una vez que el animal se sacó del agua, se colocó en la camilla de fijación y ésta última se colocó dentro de la caja contenedora; la hora en que se tomaron estas muestras para

los delfines que viajaron 3 horas fue entre las 10:30 y las 11:00 hr del día, mientras que para los delfines que viajaron 18 horas fue entre las 12:30 y 13:00 horas.

Una vez que se llegó al destino del viaje, las cajas contenedoras se bajaron del camión y se volvieron a tomar muestras de saliva y de sangre entre las 13:30 y 14:00 horas así como entre las 6:30 y 7:00 horas del otro día respectivamente.

Las muestras de saliva se tomaron con un hisopo de algodón esterilizado y pesado, el cual se introdujo, de acuerdo con la experiencia de los entrenadores en el hocico del animal hasta la altura de la garganta. En el caso de los delfines que viajaron, para poder tomar la muestra de saliva, el hocico de los delfines se abrió con la ayuda de unas toallas mojadas, ya que cuando el animal se encuentra fuera del agua aprieta fuertemente sus mandíbulas. Dichas muestras se colocaron en tubos de ensayo estériles y tapados y con una torunda de algodón. Posteriormente se pusieron en una hielera con hielo frappé para transportarlas a 4°C hasta el laboratorio en donde se congelaron a -70° C en un congelador marca REVCO hasta que se usaron para hacer las determinaciones bioquímicas correspondientes.

Las muestras de sangre se tomaron, con un sistema vacutainer en tubos al vacío sin anticoagulante, de la vena del pedúnculo caudal. Los tubos se colocaron dentro de una hielera (4°C) y se transportaron hasta el laboratorio en donde se centrifugaron a temperatura ambiente, durante 10 minutos en una centrífuga clínica, para separar el suero. Una vez obtenidos los sueros, éstos se congelaron a -70° C en un ultracongelador REVCO hasta su análisis.

### **Determinaciones químicas.**

En las muestras de saliva se midió tanto la concentración de cortisol como la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y en las muestras de sangre se midió además de la concentración de cortisol y de  $\beta$ -glucuronidasa, la concentración de malonaldehído que presentan estos animales bajo las condiciones experimentales estudiadas en esta tesis.

### **Cortisol.**

El método para medir el cortisol sigue los principios básicos del radioinmunoensayo en el cual existe una competencia entre un antígeno marcado radiactivamente y el mismo antígeno no marcado; presente ya sea en una serie de estándares o en las muestras por evaluar por un número fijo y

limitado de sitios de unión en un anticuerpo específico, y que normalmente se encuentra unido a una fase sólida (tubos de ensaye recubiertos interiormente con el anticuerpo).

En este estudio se utilizó un estuche comercial el cual contiene 100 tubos recubiertos con anticuerpos de conejo contra cortisol, cortisol marcado con  $^{125}$  y una serie de estándares conteniendo :0, 20, 50, 150, 500, 1000 y 2000 nmolas/l. Para la determinación de la concentración de cortisol en suero los estándares se usaron tal y como vienen en el estuche. Para medir la concentración en saliva, el estándar de 2000 nmolas /l se diluyó con amortiguador de Tris-HCl 0.1M pH 7.0 conteniendo 0.2% de albúmina sérica bovina para obtener las siguiente serie de concentraciones. 100, 50, 25, 10, 2.5 y 1 nmolas/l.

El procedimiento para el suero sanguíneo fue el siguiente: Se pusieron 20  $\mu$ l de cada uno de los estándares, para establecer la curva estándar, (figura 1) o de las muestras por evaluar en los correspondientes tubos conteniendo el antígeno, se adicionaron 500  $\mu$ l de cortisol radioactivo a cada tubo, los tubos se mezclaron suavemente con un agitador vortex y se cubrieron con papel parafilm y se incubaron 2 horas a 37° C. Después de este tiempo, se decantó el líquido de cada tubo y se secaron sus bocas con papel absorbente, se lavaron una vez con 1 ml de agua destilada; se agitaron y se decantó el agua secando nuevamente sus bocas con papel absorbente. Los tubos se dejan boca abajo de 2 a 3 min. La radioactividad unida al anticuerpo se midió en un contador de gamas calibrado para  $^{125}$ .

Puesto que, la concentración de cortisol en la saliva es mucho mas baja que en suero, se usó el siguiente procedimiento: Se pusieron 150  $\mu$ l de estándares a las concentraciones ya descritas para saliva, para constituir la curva estándar, (figura 2) y muestras por evaluar en los tubos correspondientes recubiertos con el antígeno y etiquetados apropiadamente. El resto del procedimiento fue igual que para el suero sanguíneo a excepción de que el tiempo de incubación fue de 30 min. a 37° C.

A las muestras tanto de sangre como de saliva se les midió también, tanto la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa como la concentración total de proteínas.

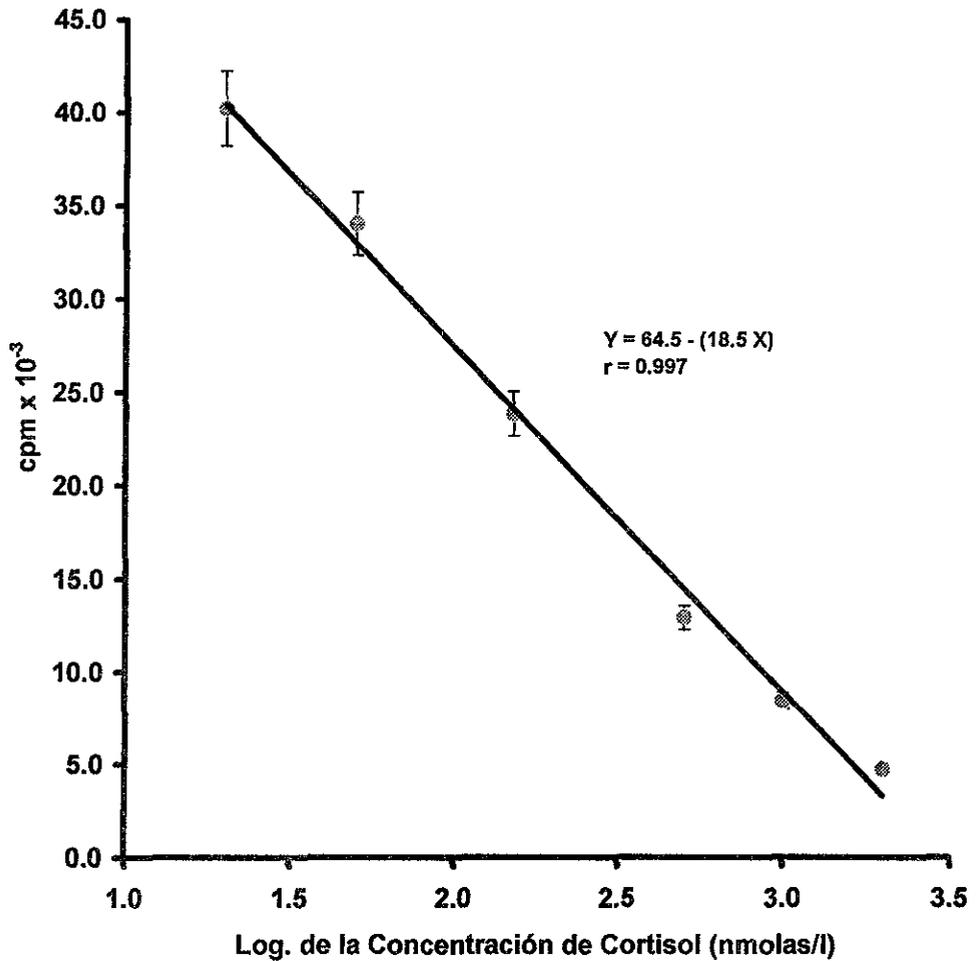


Figura 1. Curva estándar de Cortisol. En esta figura se muestra el desplazamiento del sustrato radioactivo (cpm) de los sitios de unión al anticuerpo por el sustrato no radioactivo en función del log. de su concentración en nmolas/l. Los valores representan el promedio  $\pm$  la desviación estandar de por lo menos 6 experimentos, Esta curva se usó para calcular la concentración de cortisol en sangre.

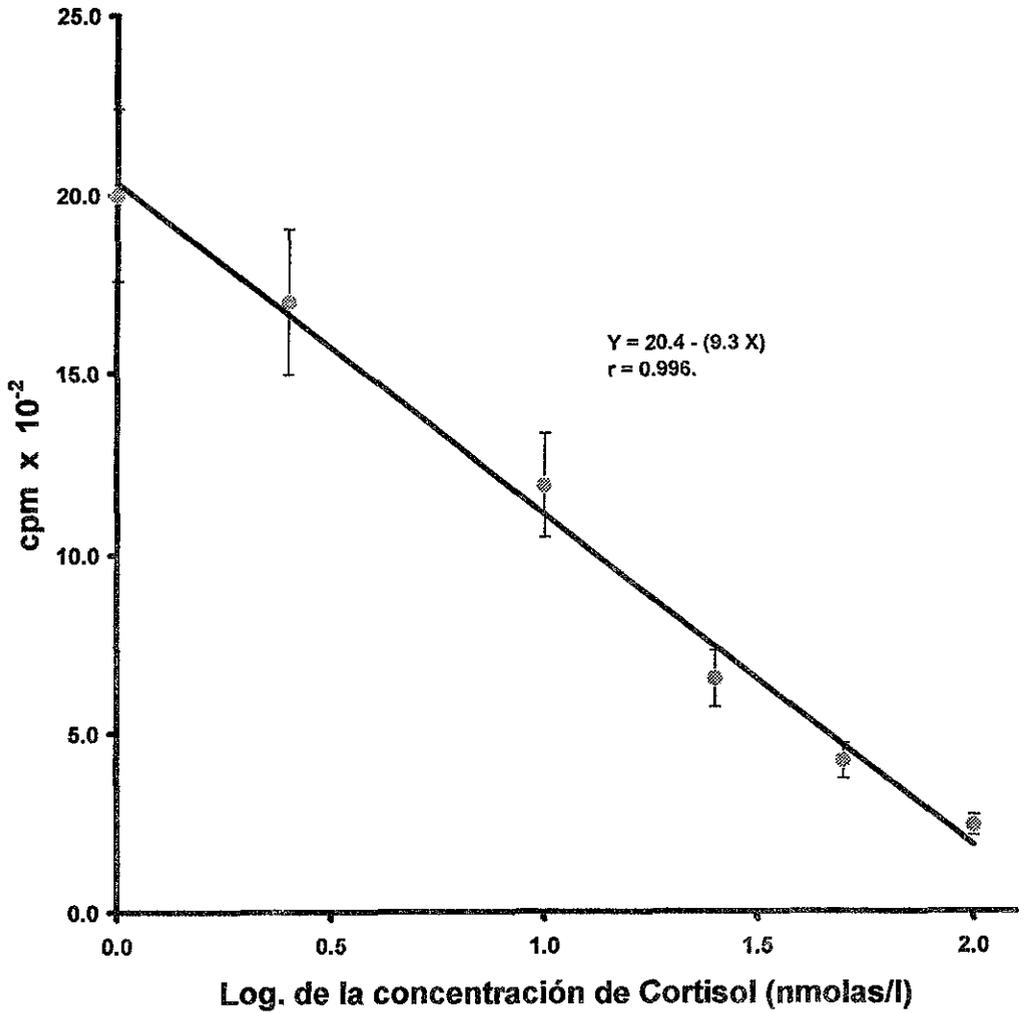


Figura 2. Curva estándar de Cortisol. En esta curva la concentración de sustrato no radiactivo fue de 1 a 100 nmolas/l y se usó para calcular la concentración de cortisol en saliva. Los valores representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de por lo menos 6 experimentos.

## **Proteínas.**

Las proteínas fueron determinadas por el método de Lowry (38) que utiliza el reactivo de Folin - Ciocalteu, el cual aumenta el desarrollo del color y la sensibilidad 10 veces, en comparación con el método de Biuret.

El método de Lowry es esencialmente una reacción de biuret (basada en la interacción de  $\text{Cu}^{+2}$  con proteínas), pero el incremento del color de la reacción en este proceso ocurre cuando los complejos tetradentados de cobre transfieren electrones al complejo ácido fosfo-molibdico/ácido fosfo-tungstíco ( $\text{Mo}^{+6}/\text{W}^{+6}$ ) que es el reactivo de Folin-Fenol. La reducción de este reactivo produce un color azul que se lee a 550 nm .

Para este método se utilizó como estándar albúmina bovina fracción V de la que se pesaron 15 mg y se disolvieron en 10 ml con una solución isotónica de NaCl en un matraz aforado. Esta solución se diluyó 1:5 para tener una concentración final de 300  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Reactivos**

Solución A.- Solución de Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2 % y de Tartrato doble de sodio y potasio 0.02 % en Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N.

Solución C.- En el momento de usarse se realiza una mezcla de 50 volúmenes de la solución A y 1 volumen de la solución B.

Solución D.- En el momento de usarse se prepara una dilución 1:3 del reactivo de Folin-Ciocalteu con agua destilada.

La curva estándar (figura 3) se encuentra constituida de la siguiente manera:

Se pusieron alícuotas de 50 a 200  $\mu\text{l}$  de estándar albúmina correspondientes a concentraciones de 15 a 60  $\mu\text{g/tubo}$  y se les agregó agua destilada hasta un volumen de 200 $\mu\text{l}$ . A los tubos se les adicionó 1 ml de la solución C incubándolos durante 20 minutos a temperatura ambiente, después se les agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución D y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos mezclando perfectamente después de cada adición.

En el caso de los sueros se hicieron diluciones 1:10 y se utilizaron alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  y en el caso de las salivas se usaron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$ . En ambos casos se les agregó agua destilada para obtener un volumen de 200  $\mu\text{l}$ . Al igual que en la curva estándar se les adicionó 1 ml de la solución C y 100  $\mu\text{l}$  de la solución D incubándose en las mismas condiciones.

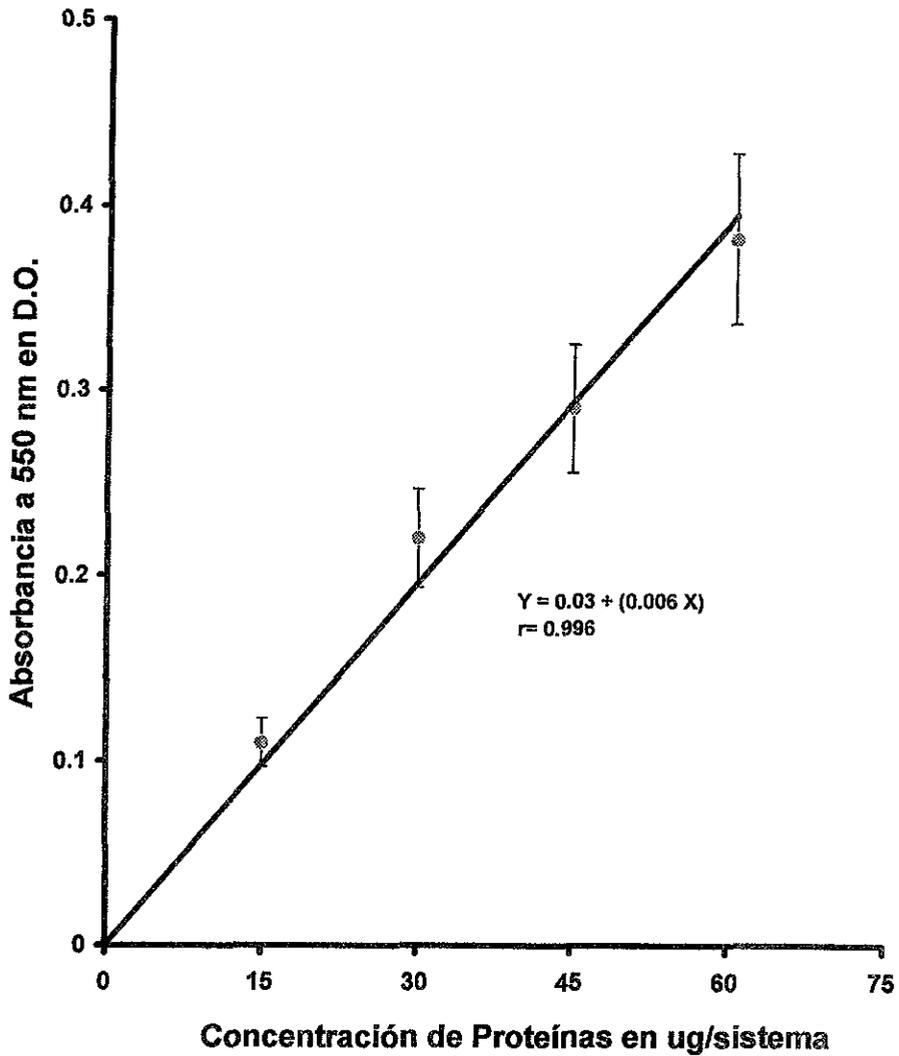


Figura 3. Curva estándar de Proteínas. En el eje de las abscisas se indica la concentración de la albúmina sérica bovina, usada como estándar, en microgramos/sistema (ug/sistema). En el eje de las ordenas se representa la absorbancia a 550 nm del complejo colorido que se forma en la reacción de Lowry. Los valores representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de por lo menos 8 experimentos. Esta curva se usó para medir la concentración de proteínas tanto en saliva como en suero de los delfines.

Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU 640 a 550 nm.

### **$\beta$ -Glucuronidasa.**

Para medir la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en ambos tipos de muestras se siguió el método de Fischman y Bemfeld (39).

Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A.- solución estándar de Fenoltaleína en etanol absoluto a una concentración de 1 mg/ml.

De esta solución se hizo una dilución 1:5 para obtener una concentración final de 200  $\mu$ g /ml.

Solución B.- Buffer de Acetato de sodio 0.2 M pH 4.7.

Solución C .- Solución de Ácido acético al 0.2 M.

El pH de la solución B se ajustó a 4.7 con la ayuda de un volumen apropiado de la solución C, usando un medidor de pH Beckman modelo Expandomatic SS-2.

Solución D.- Solución de Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 M.

Solución E solución Ácido Fenoltaleín- $\beta$ -D-glucurónico, sustrato para la enzima a una concentración de 1mM.

Todas estas soluciones se guardaron en frascos etiquetados y a 4° C en un refrigerador.

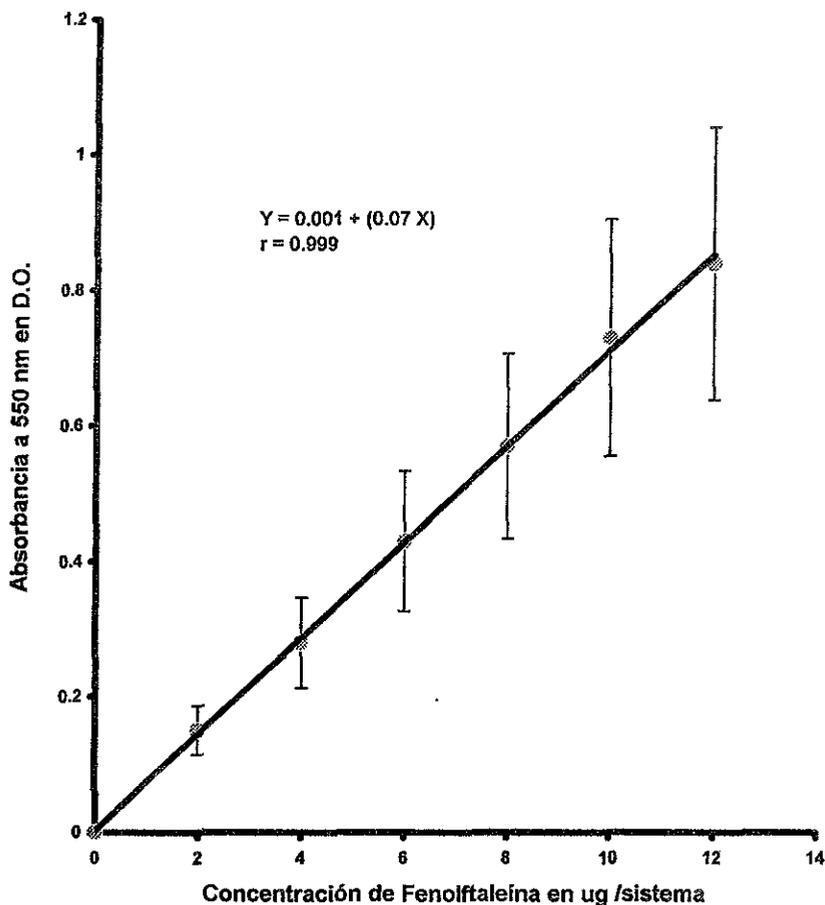
La curva estándar de fenoltaleína (figura 4) se encuentra constituida de la siguiente forma:

De la solución estándar de fenoltaleína diluida 1:5 se tomaron por duplicado alícuotas de 10 a 60  $\mu$ l correspondientes a concentraciones de 2 a 12  $\mu$ g respectivamente y se colocaron en tubos de ensaye apropiados . A todos los tubos se les agregó agua destilada a un volumen final de 200  $\mu$ l y se les adicionaron 300  $\mu$ l de buffer de fosfatos pH 4.7.

En el caso de las muestras de suero se utilizaron alícuotas de 25  $\mu$ l y en el caso de saliva las alícuotas fueron de 50  $\mu$ l y se les agregó agua destilada hasta llegar a un volumen de 100  $\mu$ l. Se les adicionaron 100  $\mu$ l de sustrato, se incluyó un blanco en el cual la muestra se sustituyó con agua y todos los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37 ° C. Para detener la reacción se les adicionaron 500  $\mu$ l de bicarbonato de sodio a todos los tubos incluyendo a los de la curva estándar y se leyeron a 550 nm.

### **Malondialdehído.**

La concentración de malonaldehído en el suero de los delfines se midió por el método descrito por Yoshioka y cols (40). Alícuotas de 500  $\mu$ l del suero de los delfines se agitaron con 2.5 ml de ácido



**Figura 4. Curva estándar de Fenolftaleína.** En el eje de las abscisas se indica la concentración de fenolftaleína en micro-gramos/sistema (ug/sistema) y en el eje de las ordenadas la absorbancia a 550 nm en unidades de densidad óptica (D.O.). Esta curva sirvió para calcular la actividad de la beta-glucuronidasa tanto de la saliva como del suero de los delfines. Los valores representan el promedio  $\pm$  la desviación estandar de por lo menos 8 experimentos.

tricloroacético (TCA) al 20 % en tubos de centrifuga de 10 ml. A estas mezclas se les adicionó 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67 %, se mezclaron por agitación y se calentaron por 30 min en un baño de agua hirviendo y después de este tiempo se enfriaron rápidamente en un baño con hielo. Después se les adicionaron 4 ml de alcohol n-butílico y se agitaron vigorosamente. Las mezclas se centrifugaron a 3000 rpm en una centrifuga clínica Clay Adams durante 10 min a temperatura ambiente. La capa de butanol que se formó en cada tubo se transfirió a otro tubo y el contenido de malondialdehído se determinó por la absorbancia a 535 nm leída en un espectrofotómetro Beckman DU-640.

La curva estándar (figura 5) se estableció de la siguiente manera:

De una solución estándar conteniendo 10 nmolas por ml de malondialdehído-bis-acetil dimetilo (1,1,3,3,tetrametoxi propano) en TCA al 20 %, se tomaron por duplicado alícuotas de 20- 100  $\mu$ l correspondientes a concentraciones de 0.2 a 1.0 nmolas por ml, el volumen se ajustó a 2.5 ml con TCA y se siguió el mismo procedimiento que para las muestras de suero.

#### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa Sigma Stat versión 2.0.

Las diferencias estadísticas entre promedio de más de 3 grupos se calcularon usando el análisis de variancia por rangos de Kruskal-Wallis y cuando se detectaron diferencias significativas, éste fue seguido de la prueba de comparación múltiple de Duncan. Cuando se compararon solo dos grupos se usó la prueba de Mann-Whitney.

El análisis estadístico de la concentración de cortisol y de  $\beta$ -glucuronidasa en la saliva de los delfines durante el transcurso del día se hizo usando el análisis de variancia de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey con  $\alpha = 0.5$

## **RESULTADOS.**

La saliva es un líquido incoloro, transparente o a veces translúcido con una viscosidad baja y una densidad promedio de 1.005 (41). Su atractivo para el bioanálisis descansa en el hecho de que está relativamente libre de sustancias interferentes, es fácilmente extraíble por solventes orgánicos y se

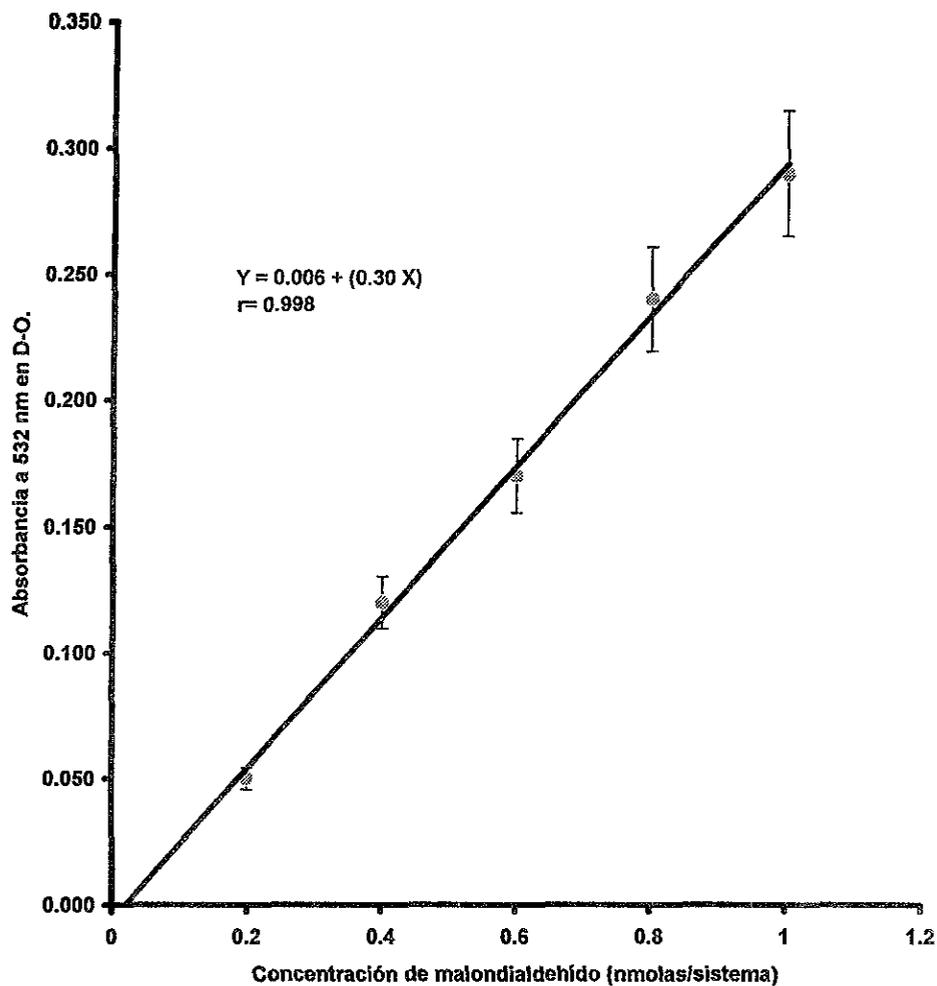


Figura 5. Curva estándar de malondialdehído para determinar la lipoperoxidación en el suero de los delfines. En las ordenadas se establecen las lecturas en densidad óptica a 532 nm. En las abscisas se indica la concentración en nmolas/sistema. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de por lo menos 7 experimentos.

piensa que refleja los niveles de drogas y componentes químicos libres (no unidos a proteínas) de la sangre (41). Es probable que compuestos no ionizables como los esteroides pasen rápidamente del plasma sanguíneo a la saliva y por lo tanto el análisis de este fluido biológico podría constituir un método no invasivo (41).

El método de radioinmunoensayo, utilizado en este trabajo fue lo suficientemente sensible como para obtener resultados reproducibles en las muestras de saliva obtenidas en las condiciones mencionadas en material y métodos.

### **Delfines control.**

Los valores obtenidos para la concentración de cortisol en la saliva de los delfines considerados como controles (aquéllos con un largo período de adaptación al cautiverio, más de 8 años), mostraron una variación diaria. En la figura 6 se muestra el comportamiento de la concentración salival de cortisol medida a diferentes horas del día. Esta concentración disminuyó gradualmente con el transcurso del día. Desde un valor promedio de  $2.5 \pm 0.48$  ng/ml medida a las 9:30 hs hasta un valor de  $1.0 \pm 0.82$  ng/ml obtenido a las 17:30 hs y cuya diferencia es estadísticamente significativa  $p < 0.05$  pasando por un valor intermedio de  $1.3 \pm 0.3$  ng/ml obtenido a las 13:30 hs. Este comportamiento de la concentración de cortisol en la saliva de los delfines es muy similar al observado por Katz y Shanon (9) para la concentración de cortisol en la saliva de los humanos. El inserto en la figura 6 muestra dichos valores con fines comparativos exclusivamente.

Se sabe en la actualidad que los glucocorticoides pueden influir en la estabilidad de las membranas lisosomales, aumentándola o disminuyéndola en diferentes casos (33, 34). A este respecto el análisis de la actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa, en la saliva de los delfines control mostró también un comportamiento diario muy similar al observado para el cortisol. La figura 7 muestra los valores de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa expresado en ng de sustrato transformado por miligramos de proteína/hora ( $\text{ng} \times \text{mg proteína}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ). Se puede observar, en dicha figura, que la actividad de esta enzima tiene un pico a las 9:30 hs de  $54 \pm 6$  ng de fenoltaleína liberada, para después declinar a un valor de  $42 \pm 4$  ng a las 13:30 hs, hasta llegar a un valor de  $24 \pm 5$  ng a las 17:30 hs, el tiempo más tardío del día, estudiado por nosotros.

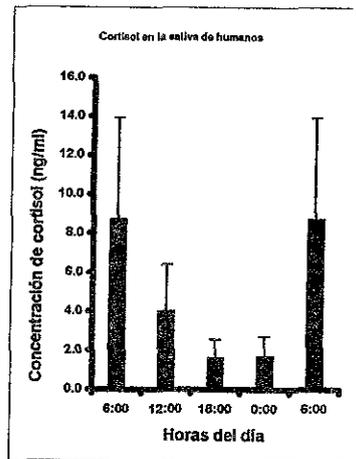
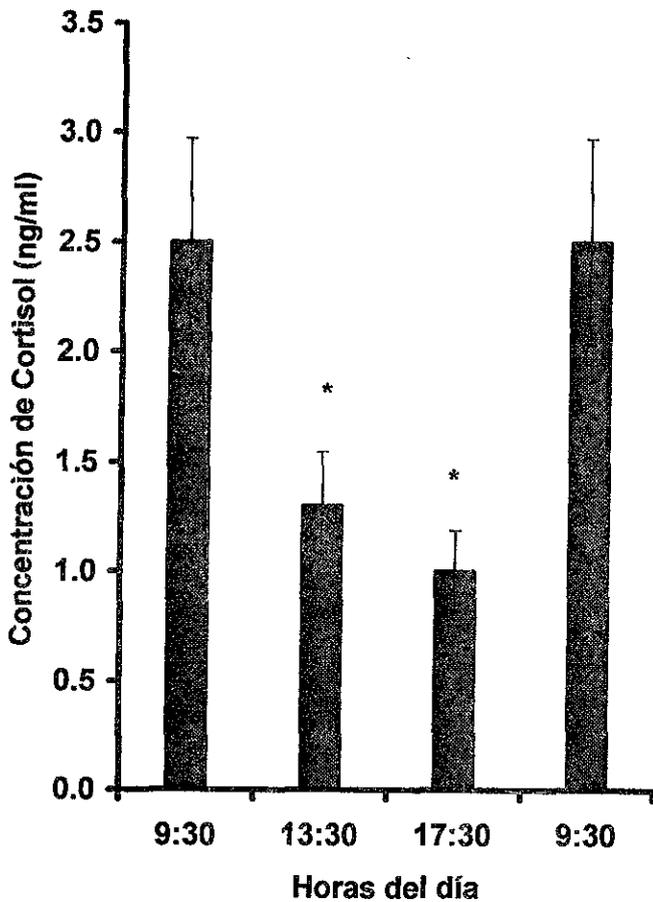


Figura 6. Concentración de cortisol a diferente horas del día en la saliva de dos delfines Tursiops truncatus mantenidos en cautiverio por más de 8 años. Las barras representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de por lo menos 3 experimentos. Los asteriscos indican una diferencia estadística significativa  $p < 0.05$  cuando se comparan con el valor a las 9:30 horas por medio de un ANOVA de una vía seguido de un procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Inserto: Valores, obtenidos de la literatura, de cortisol en la saliva de humanos que muestran un ritmo circadiano.

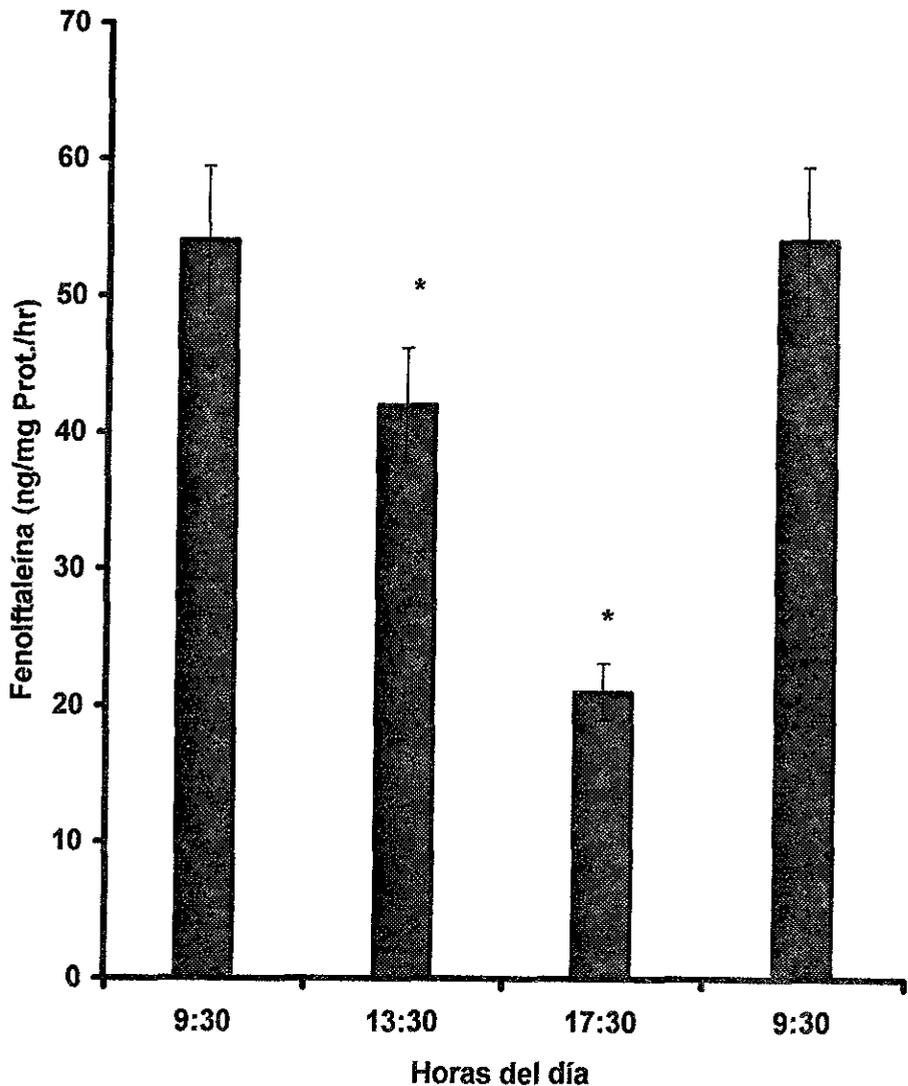


Figura 7. Actividad de beta-glucuronidasa a diferentes horas del día en la saliva de dos delfines Tursiops truncatus mantenidos en cautiverio por mas de 8 años Las barras representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de por lo menos 3 experimentos. Los asteriscos indican una diferencia estadística significativa  $p < 0.05$  cuando se comparan con el valor a las 9:30 horas por medio de un ANOVA de una vía seguido de un procedimiento de comparación múltiple de Tukey.

## **Delfines transportados.**

En otros dos grupos de delfines constituido el primero por 2 hembras y un macho y por 2 machos el segundo y los cuales fueron transportados de un delfinario a otro en un lapso de 3 y de 18 horas respectivamente, se midieron los niveles de cortisol así como la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el suero sanguíneo de dichos animales.

Es apropiado mencionar que en los animales que viajaron durante 3 y 18 horas, la cantidad de muestras de saliva fue tan pequeña que fue imposible medir la concentración de cortisol por lo que solo se mencionaran los resultados obtenidos en el suero sanguíneo.

Dadas las dificultades inherentes al proceso de captura y de inmovilización de los animales solo se pudieron tomar muestras al inicio y al final del proceso de transporte.

Nuestros resultados relacionados con el sexo de los delfines se muestran en la figura 8. Como se puede observar cuando el transporte duró aproximadamente 3 horas, los cambios tanto en la concentración del cortisol como en la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa de suero fueron similares en ambos sexos.

Sin embargo es conveniente mencionar que el índice de estrés durante el transporte de 3 horas, definido por nosotros como la relación del valor de cortisol al final de este proceso con respecto al valor obtenido al inicio es mayor en los machos que en las hembras (3.5 vs 1.8, tabla 1). En esta misma tabla podemos observar que para la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa esta relación mostró, un comportamiento similar (2.2 en las hembras vs 2.7 en los machos).

Dado que el número de animales estudiados, tanto para cortisol como para  $\beta$ -glucuronidasa durante el transporte de 3 horas fue muy pequeño, además la diferencia entre hembras y machos no fue estadísticamente diferente ( $p = 0.267$  y  $p = 0.133$ , prueba de Kruskal,-Wallis) y debido al hecho de que en el proceso de transporte con duración de 18 horas solo se estudiaron 2 machos, decidimos comparar los resultados entre ambos procesos con respecto al tiempo sin tomar en consideración el sexo.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos para la concentración de cortisol y para la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa después de 3 ó 18 horas de transportación. Cuando los valores de la concentración de cortisol obtenidos de suero de delfines que han viajado durante 3 horas (F) se

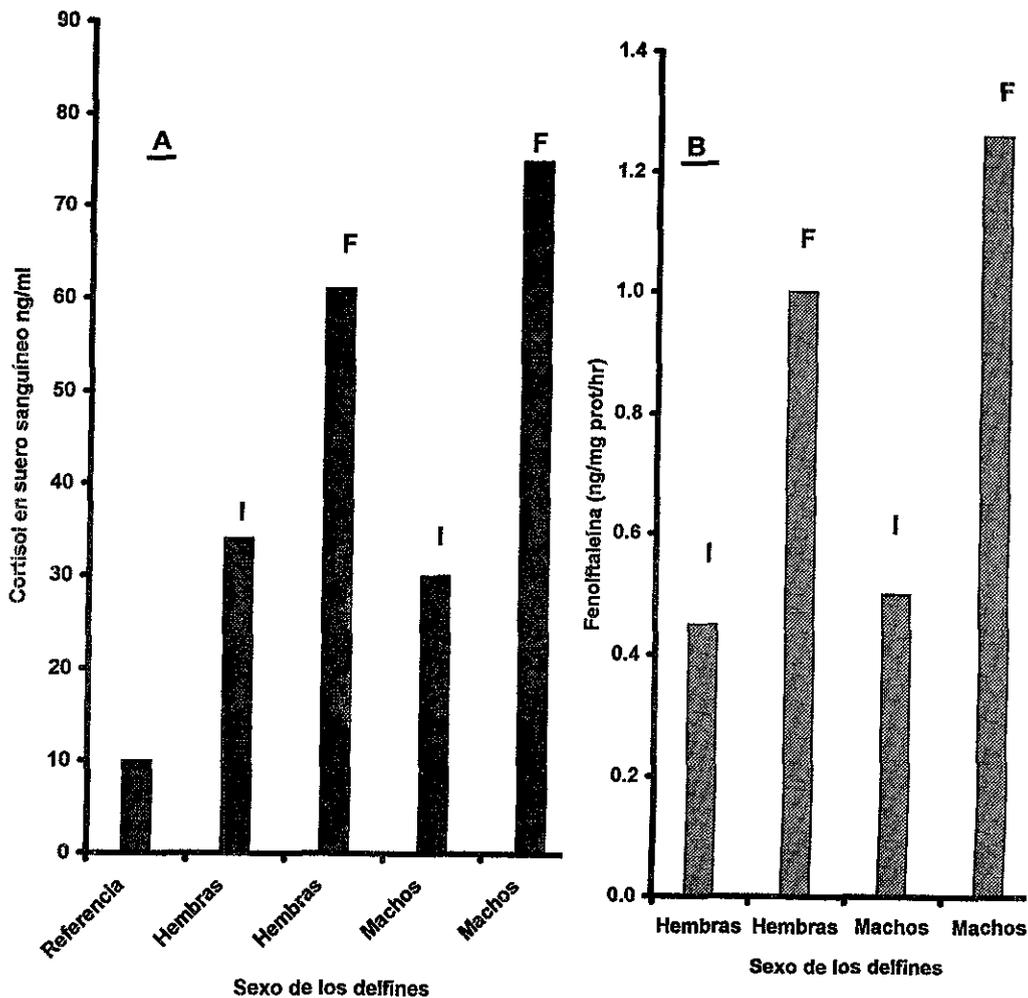


Figura 8. Efecto del Sexo sobre los niveles del cortisol (Panel A) y sobre la actividad de la beta-glucuronidasa (Panel B) de los delfines *Tursiops truncatus* inducidos por el estrés producido por el proceso de transportación durante 3 horas. Las barras representan el promedio de los resultados obtenidos para dos hembras y los valores de un solo animal macho. El análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA sobre rangos de Kruskal-Wallis indica que no hubo diferencia significativa entre ambos sexos sobre los valores al inicio (I) y al final (F) del transporte, tanto de cortisol como de la actividad de la beta-glucuronidasa,  $p=0.267$  y  $0.133$  respectivamente.

Tabla I CAPACIDAD DE RESPUESTA EN RELACIÓN CON EL SEXO AL ESTRÉS DE LA TRANSPORTACIÓN DEL DELFÍN TURSIOPS TRUNACATUS.

	MACHOS	HEMBRAS
CORTISOL	2.5	1.8
$\beta$ -GLUCURONIDASA	2.7	2.2

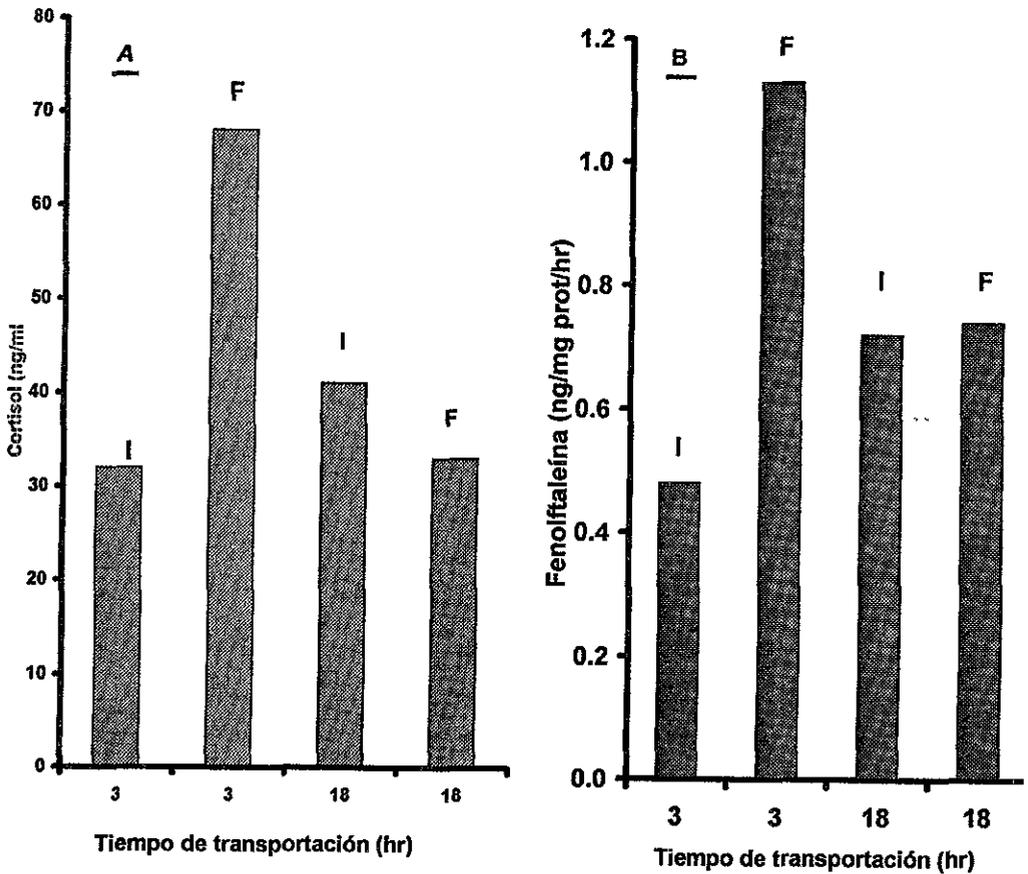


Figura 9. Efecto del tiempo de transportación (3 y 18 hr) sobre los niveles séricos del cortisol (Panel A) y sobre la actividad de la beta-glucuronidasa (Panel B) de los delfines *Tursiops truncatus*. Las barras representan, para el transporte de 3 horas, el promedio de los valores de 3 animales y para el transporte de 18 hr, el promedio de los valores de 2 animales. La prueba de ANOVA sobre rangos de Kruskal-Wallis seguida por el método de comparaciones múltiples de Dunn, indica una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) sólo entre los valores al inicio (I) y al final (F) del transporte de 3 horas tanto para el cortisol como para la beta-glucuronidasa.

comparan con los valores obtenidos antes de iniciar el transporte (I), se observa que aquéllos muestran un incremento significativo de 32 a 68 ng/ml (ANOVA por rangos,  $p < 0.05$ ).

Este mismo comportamiento se observa para la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa, aunque el incremento al final del transporte es mucho mayor (0.47 vs 1.09 ng/mg prot /hora,  $p < 0.005$ ) que para el cortisol.

En esta misma figura 9, se muestran los resultados obtenidos al inicio (I) y al final (F) de un transporte de 18 horas. Curiosamente, los valores a este tiempo de ambos parámetros (cortisol y  $\beta$ -glucuronidasa) fueron similares (Mann-Whitney,  $p = 0.33$  y  $p = 1.00$  respectivamente), incluso la concentración de cortisol al final del transporte (F) sufrieron un pequeño descenso aunque probablemente no significativo ( $p = 0.33$ ). Cuando se analiza la capacidad de respuesta al estresor ó índice de estrés, calculada por la relación F/I se observa que el índice de estrés es mayor en lapsos de transporte cortos (3 horas) que cuando los delfines viajan por períodos largos de 18 horas (tabla II). Cuando se analizan los resultados obtenidos para la determinación del contenido de malondialdehído (como índice de la peroxidación de lípidos) en el suero de los delfines sometidos a estrés por inmovilización y transporte, observamos nuevamente un aumento al final (F) del proceso de transporte comparado con el valor obtenido al inicio (I). Los valores presentados en la figura 10 indican que para el transporte de 3 horas la diferencia es estadísticamente significativa (Mann-Whitney  $p < 0.05$ ), mientras que para el transporte de 18 horas el aumento al final del proceso, no es significativo.

Tabla II. CAPACIDAD DE RESPUESTA AL TIEMPO DE TRANSPORTACIÓN DEL DELFÍN TURSIOPS TRUNCATUS.

	3 HORAS	18 HORAS
CORTISOL	2.1	0.8
$\beta$ -GLUCURONIDASA	2.4	1.02

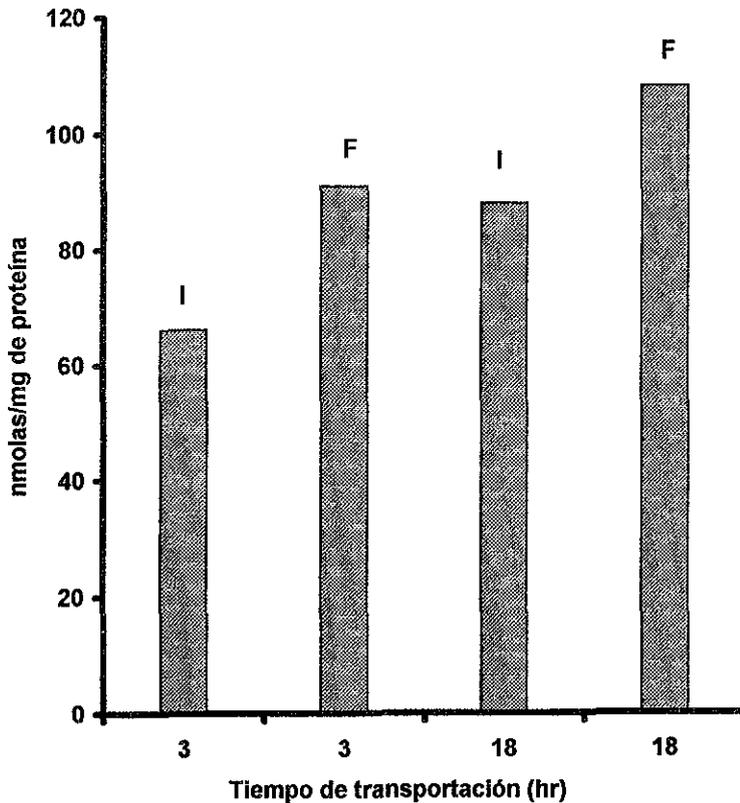


Figura 10. Concentración de malondialdehído (substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS) medida en el suero de delfines Tursiops truncatus que viajaron durante 3 y 18 horas. Los valores graficados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de por lo menos 3 animales ( $66 \pm 14$  vs  $91 \pm 16$ ) para el transporte de 3 horas y el promedio y los valores límites (superior e inferior) de 2 animales ( $88.5 \pm 5.5$  vs  $108.5 \pm 2.5$ ) para el transporte de 18 horas.

## DISCUSION.

La existencia, en el humano, de un ritmo circadiano en la secreción de cortisol se ha documentado ampliamente y se refleja tanto en la concentración plasmática como en la excreción urinaria (42, 43).

Recientemente se ha demostrado que la saliva del humano refleja también una variación diurna en los niveles de cortisol (9). Aunque hasta la fecha no se sabe la importancia y el papel real de la presencia de un ritmo circadiano en los niveles de cortisol, fluctuaciones circadianas en los niveles circulantes de glucocorticoides se han demostrado también en otros mamíferos como roedores y monos (44). Los resultados presentados en este trabajo (Figura 6) demuestran que los delfines nariz de botella (Tursiops truncatus), bajo condiciones las cuales en esta tesis se han considerado como "normales" debido a que los delfines usados como control tienen un largo tiempo de adaptación al cautiverio, también presentan un ritmo diurno en la concentración salival de cortisol, lo cual parece indicar que también podrían tener un ritmo circadiano.

La concentración más alta se encontró en la mañana (9:30 hs) y las más bajas en la tarde (17:30 hs) y cuyas diferencias son estadísticamente significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ). Es pertinente mencionar aquí que estamos conscientes de que se pueden introducir fallas en el análisis de los resultados provenientes de un número pequeño de animales. Sin embargo, consideraciones prácticas limitan el acceso a estos animales tan costosos.

Así por ejemplo los animales que no se transportaron no se pudieron sangrar por lo que solo se tomaron muestras de saliva cuya práctica resultó también con ciertas dificultades, la más importante de ellas fue la de evitar que las muestras se contaminaran con el agua del estanque, para esto los delfines tuvieron que salir a plataforma, lo cual no siempre fue fácil.

Las determinaciones de cortisol se han usado ampliamente en valorar la función adrenocortica en relación con el estrés. Puesto que el muestreo del suero o del plasma sanguíneo, el cual constituye un método invasivo de obtener la muestra (45, 46), está asociado con cierto grado de estrés, y puede enmascarar los resultados, se hace necesario un método más inocuo de obtener las muestras a analizar. La colección de saliva está considerada como un método no invasivo y se ha demostrado, por lo menos en el humano que esta libre de estrés (6) por lo tanto la determinación de la concentración de cortisol en la saliva puede ser un método más apropiado para medir la función adrenal bajo la acción de diferentes tipos de estresores. Además se ha demostrado que la

concentración de cortisol en saliva representa el nivel de cortisol libre (no unido a proteínas), el cual se considera el cortisol activo (9, 45).

Por otro lado se sabe también que los glucocorticoides incluyendo el cortisol pueden influir en la estabilidad de las membranas lisosomales (34) aumentándola o disminuyéndola en diferentes casos (35). Las peculiaridades del efecto hormonal depende de la dosis, su concentración sanguínea y de los parámetros anatómicos y fisiológicos de los tejidos que responden a las hormonas. Actualmente se sabe que las diferencias sexuales y por ende los esteroides gonadales influyen la función hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPAC) basal en roedores (44, 47). Buckingham y cols. (48) han demostrado que las concentraciones periféricas de ACTH/corticosterona aumentan durante el proestro en ratas con un ciclo estral normal. A este respecto se ha observado que la ovariectomía disminuye la síntesis y/o la liberación de ACTH/corticosterona, un efecto que se puede revertir por la administración de esteroides exógenos (49). Las ratas hembras que exhiben ciclos estrales irregulares también presentan anomalías en la periodicidad circadiana de la secreción de corticosterona (50).

Existe también en la literatura suficiente evidencia que demuestra en el humano una correlación entre la composición química de la saliva y el estado hormonal del organismo. Algunos de estos estudios han mostrado patrones característicos en el comportamiento de los componentes de la saliva como la glucosa, el sodio, al ácido siálico (23-25) y algunas actividades enzimáticas (particularmente lisosomales) (26) en relación con los niveles hormonales que inducen ovulación.

Tomando en cuenta lo anterior resulta evidente que los cambios en los niveles de cortisol en la saliva de los delfines podrían tener una contraparte muy similar en los niveles de la actividad de las enzimas lisosomales ( $\beta$ -glucuronidasa) tanto en su comportamiento circadiano como en su comportamiento ultradiano por la influencia de algún estresor.

Los resultados presentados en la figura 7, muestran que la actividad de esta enzima en la saliva de los delfines control tiene un comportamiento diario muy semejante al del cortisol.

Este es, hasta donde sabemos el primer estudio que registra la presencia, en la saliva de los delfines Tursiops truncatus, de un ritmo diario tanto en la concentración de cortisol (muy similar al del humano, figura 6) como en la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y cuya similitud de comportamiento resultó sorprendente y estimulante como para proponer, a través de un estudio con mayor número de

animales, la determinación de la  $\beta$ -glucuronidasa como un método no radioactivo, económico y más fácil para medir el estrés en los mamíferos incluido el humano.

Por otro lado resulta importante mencionar, además que los mamíferos marinos han realizado muchos ajustes metabólicos y fisiológicos importantes con el objeto de adaptarse a una vida totalmente acuática (1).

En este contexto es posible suponer que el hecho de que los delfines pudieran tener un ritmo circadiano en la concentración de cortisol al igual que otros mamíferos terrestres, podría ser indicativo de la importancia que tiene este mecanismo en la sobrevivencia de los mamíferos en general.

La medición de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa cuya determinación se puede obtener dentro de una hora después de tomar la muestra, podría servir en conjunción con la determinación de la velocidad de sedimentación de los eritrocitos y los niveles de hierro sérico (5) como un indicador pronóstico de las reacciones adaptativas de los delfines a los estresores.

La resistencia al estrés en los animales está relacionada a la tipología del comportamiento individual (51). Generalmente el organismo responde al estrés a través de un aumento en la actividad adrenal, aumentando los niveles sanguíneos de cortisol (52).

Diferencias de sexo en los niveles basales de corticosterona y/o en la secreción de glucocorticoides en respuesta a los estresores ambientales se han encontrado en varias especies de mamíferos como son: el ratón (53), la rata (47, 54), el cobayo (55) y en un menor grado en el mono (56) y en el humano (57). En general las concentraciones de corticosteroides son más altas en las hembras y además las hembras muestran una liberación de glucocorticoides mayor que los machos en respuesta al estrés. Nuestros resultados, los cuales se muestran en la figura 8 aunque muestran una pequeña diferencia en los valores de cortisol sérico entre hembras y machos al inicio (I) del transporte (34 Vs 30 ng/ml respectivamente), provienen de un número de animales muy pequeño por lo que es difícil analizar desde un punto de vista estadístico esta diferencia. En contraste con lo publicado respecto a que la respuesta evocada por un estresor es mayor en las hembras que en los machos, nuestros resultados parecen indicar que en los delfines esta respuesta está invertida con respecto al sexo, siendo mayor en los machos (tabla I). Sin embargo la dificultad en el análisis estadístico impuesta por el número pequeño de casos, hace poco claro la posible existencia de una diferencia real entre los sexos en el caso de los delfines.

Es probable que la igualdad en los niveles de cortisol entre hembras y machos este relacionada con los cambios fisiológicos y metabólicos realizados por los delfines para afrontar las diferentes situaciones de estrés de la misma forma tanto por las hembras como por los machos.

Sin embargo como se puede observar en la figura 8 y tabla I la capacidad de respuesta medida por la relación del valor final (F) entre el valor inicial (I) (F/I) es mayor en los machos que en las hembras.

Smith y Horman (58) han propuesto que si los patrones rítmicos de secreción CRH/ACTH/Cortisol se alteran por la presencia normal de los esteroides gonadales, entonces esas diferencias representan valores basales fisiológicos a partir de los cuales se pueden medir los cambios en la respuesta hipotálamo-hipófisis-adrenal inducida por los estresores. Estas medidas se usan para valorar la habilidad de un estresor para influenciar la reproducción (58). Se ha observado en otras especies de mamíferos como son los bovinos, que la presencia de los niveles altos de cortisol pueden inducir alteraciones importantes en el proceso de parto (59).

A este respecto es posible considerar que una respuesta menor a los estresores por parte del delfín hembra podría representar un mecanismo para asegurar una reproducción adecuada.

Nuestros resultados en relación con los niveles séricos de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa medidos en el suero sanguíneo de los delfines, son similares a los encontrados para el cortisol en los mismos animales. La diferencia encontrada entre hembras y machos es muy pequeña con un valor ligeramente mayor en los machos 0.45 ng / ml Vs 0.50 ng / ml respectivamente sin embargo esta diferencia no parece ser estadísticamente significativa.

Existen muy pocos estudios que establezcan los niveles normales de cortisol en delfines, además, parece evidente que la captura y la subsecuente separación de los animales del agua antes de obtener las muestras, inducen cierto grado de estrés. No obstante Thompson y Geraci (20) encontraron valores de cortisol sanguíneo "reposo", es decir dentro de los 10 minutos posteriores a una captura tranquila, de 11.0-14.5 ng / ml, valores muy similares a los encontrados en otros animales silvestres medidos dentro del mismo lapso de tiempo después de la captura (60, 61). A este respecto nuestros resultados presentados en la figura 8 sobre los niveles de cortisol sanguíneo medidos en las muestras tomadas después de la captura y poco antes del inicio (I) son más altos (30-34 ng / ml), de los valores de "reposo" encontrados por Thompson y Geraci y que se muestran en dicha figura como referencia. Esta discrepancia en nuestros resultados probablemente se debe a que en nuestros

experimentos las muestras de sangre se tomaron entre los 45 y 60 minutos de tiempo transcurrido desde el inicio de la captura y hasta después de sacar a los animales del agua y colocarlos en la camilla correspondiente. Thompson y Geraci (20) encontraron que 30 minutos después de sacar a los delfines del agua los niveles de cortisol se elevaron entre el 66 y 70 %.

Cuando las concentraciones de cortisol y la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa se midieron en el suero sanguíneo de los delfines que viajaron durante 18 horas, los valores obtenidos resultaron muy interesantes. Con la finalidad de no complicar el análisis de los mismos se tomaron en cuenta dos consideraciones: 1) Que los valores obtenidos en estas condiciones (18 horas) provienen solamente de delfines machos y 2) Dado que la diferencia de los valores obtenidos para cortisol y  $\beta$ -glucuronidasa entre hembras y machos para delfines que viajaron 3 horas no fueron significativas, mezclamos dichos valores y solamente se analizaron los valores obtenidos al inicio (I) y al final (F) de cada lapso de tiempo.

Los resultados se muestran en la figura 9 y se puede observar que después de 18 horas los delfines parecen compensar el efecto estresante del proceso de transportación. Este efecto se puede deber a dos razones: 1.- Los mecanismos de adaptación a situaciones de estrés para delfines Tursiops truncatus funcionan adecuadamente como para que después de 18 horas los niveles de cortisol inclusive disminuyan, presentando un efecto contrario al observado después de 3 horas y 2.- Que las condiciones de transporte que se utilizaron, como son el mantener a los animales siempre húmedos, mantenerlo a temperaturas bajas por la adición de hielo al agua, mantener siempre cubierta su piel con pomada Capent para evitar la deshidratación de los animales, disminuyen las condiciones de estrés. Una tercera explicación sería, desde luego, que si los delfines tienen un ritmo circadiano como los demás mamíferos los valores de estos parámetros podrían estar en sus niveles bajos o estarían iniciando apenas su elevación circadiana.

Los resultados obtenidos para la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa fueron similares a los del cortisol.

En la tabla II presentan los valores para la capacidad de respuesta en la cual se puede observar que siempre es mayor para las 3 horas que para las 18 horas. Puede observarse también que está capacidad de respuesta siempre fue mayor para la  $\beta$ -glucuronidasa que para cortisol. Si además se toma en cuenta que el volumen para medir  $\beta$ -glucuronidasa es 10 veces menor que el necesario para medir cortisol, resulta evidente que medir la actividad de algunas actividades de enzimas lisosomales,

sobre todo aquellas relacionadas con la degradación de macromoléculas capaces de proporcionar energía, podría tener ciertas ventajas para medir el efecto de diferentes estresores, sobre todo si se mide en muestras de saliva que como ya se mencionó, la toma de las mismas, esta libre de estrés.

Recientemente se ha demostrado que el estrés emocional se acompaña de la activación de procesos mediados por radicales libres particularmente la peroxidación de lípidos (28, 29). La lipoperoxidación es frecuentemente el primer parámetro al cual se enfocan los investigadores cuando quieren probar la intervención de los radicales libres en el daño celular.

En el estado sano, la lipoperoxidación esta implicada en la regulación de la permeabilidad membranaral y la actividad de enzimas unidas a la membrana incluyendo enzimas lisosomales mientras que los lisosomas regulan tanto la formación de hidroperoxidación de lípidos así como la hidrólisis de los productos de la lipoperoxidación.

Estos procesos, normalmente, están regulados por sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (62). Sin embargo el grupo de Mori (28) ha demostrado que el estrés emocional puede inducir la formación de especies de oxígeno reactivos (ROS en Inglés) que dañan estas defensas antioxidantes, llevando al daño oxidativo y a un cambio considerable del balance entre los factores oxidativos y antioxidativos particularmente en el cerebro.

Nuestros resultados, los cuales se muestran en la figura 10, sobre los valores de malondialdehído, (MDA) en el suero de los delfines estudiados durante el proceso de transporte tanto a las 3 horas como a las 18 horas muestran que dichos valores son más altos al final (F) que al inicio (I) del experimento en ambos grupos de animales ( $66 \pm 14$  vs  $91 \pm 16$  y  $88.5 \pm 5.5$  vs  $108.5 \pm 2.5$  nmolas/mg prot respectivamente). Estos resultados indican que la inmovilización a la que son sometidos los delfines durante el transporte induce la peroxidación de lípidos probablemente como resultado de procesos inducidos por radicales libres. Como se puede observar también, en esta figura 10 que los valores de malondialdehído en los delfines que viajaron durante 18 horas son más altos en ambos tiempos; sin embargo la capacidad de respuesta F/I es mayor en los delfines que viajaron durante 3 horas (1.4) que en los que viajaron 18 horas (1.2). Estos resultados son difíciles de explicar, debido a que no se hicieron estudios circadianos formales, por lo que no podemos saber si el valor al inicio de los delfines que viajaron 18 horas se debe a la hora del día en la que se tomó la muestra sanguínea o si representa una respuesta a una manipulación de mayor duración. Otra posible explicación es que

los delfines seleccionados para viajar 18 horas tienen una mayor sensibilidad al estrés emocional impuesto por la inmovilización, que los delfines que viajaron 3 horas.

En nuestros experimentos es probable que la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa lo cual es prácticamente igual al principio como después de 18 horas de transporte sea una consecuencia del efecto de los radicales libres sobre la lipoperoxidación de las membranas celulares particularmente la membrana lisosomal disminuyendo su fluidez membranal haciéndola más rígida y por lo tanto inhibiendo a largo tiempo la liberación de enzimas lisosomales. Otra posibilidad que podría explicar estos resultados es que sea a nivel del cerebro que se produzca una lipoperoxidación y particularmente en el hipotálamo por lo que la señal para la liberación de cortisol por las adrenales esta inhibida y se produzca una disminución en los niveles de cortisol después de un largo tiempo de estrés (18 horas). Sin embargo cabe mencionar dos cosas: 1.- Que este mecanismo no necesariamente sea un proceso dañino al cerebro del delfin sino que forme parte de un mecanismo regulador de la respuesta o adaptación al estrés y 2.- Que esta hipótesis es tentativa y que la comprobación de la misma podría involucrar estudios más complejos fuera del alcance de esta tesis.

## CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir que los niveles de cortisol en la saliva del delfin Tursiops truncatus presentan un comportamiento diurno muy similar al observado en el humano y en otros mamíferos, y aunque en realidad no se hicieron estudios circadianos formales, este comportamiento puede ser el reflejo de un ritmo circadiano presente también en los delfines.

Consideramos que este es el primer estudio en el que se demuestra que la medición de algunas actividades enzimáticas y específicamente de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucuronidasa pueden servir como un indicador del grado de estrés al que puede estar sometido un organismo.

La medición de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa aún en sangre, cuya determinación se puede obtener dentro de una hora después de tomar la muestra, podría ser un método no radioactivo, y económico el cual a su vez podría servir en conjunción con la determinación de la velocidad de sedimentación de los eritrocitos y los niveles de hierro sérico como un indicador pronóstico de las reacciones adaptativas de los delfines a los estresores.

La toma de muestras de saliva es una técnica considerada libre de estrés, por lo tanto pensamos que si se puede establecer como rutina, el tomar muestras de saliva de delfines podría ser un proceso menos estresante y probablemente más fácil que la toma de muestras sanguíneas para el análisis de algunos parámetros relacionados con el estado de enfermedad de éstos animales.

Finalmente concluimos que la inmovilización a la que se someten los delfines durante el transporte induce la peroxidación de lípidos a través de procesos metabólicos inducidos por radicales libres.

- 14.- Brown G.M., Gota L.J., Penney D.P., and Reichlin S. (1970). Pituitary-adrenal function in the squirrel monkey. *Endocrinology*. 86: 515-529.
- 15.- Cassoria F.G., Albertson B.D., Choursos G.P., Booth J.D., Renquist D., Lipsett M.B., Loriaux D.L., (1982) The mechanism of hypercortisolemia in the squirrel monkey. *Endocrinology*. 111: 448-451.
- 16.- Chrousos G.P., Loriaux D.L., Brandon D., Shull J., Fenquist D., Hogan W., Tomota M., Lipsett M.B. (1984). Adaptation of the mineralocorticoid target tissues to the high circulating cortisol and progesterone plasma levels in the squirrel monkey. *Endocrinology*. 115 :25-32.
- 17.- Mendoza S.P., Hennessy M.B., Lyons D.M (1992). Distinct immediate and prolonged effects of separation on plasma cortisol in adult female squirrel monkeys. *Psychobiology*. 20: 300-306.
- 18.- Miluk.Kolasa B., Obminski Z., Stupnicki R, Golec L. (1994) Effect of music treatment on salivary cortisol in patients exposed to presurgical stress. *Exp Clin Endocrinol*. 102: 118-120
- 19.- Kirby V.L., (1990), *Endocrinology of marine mammals*. In *CRC Handbook of marine mammals medicine, health, disease and rehabilitation*, Dierauf L.A. Ed. American Veterinary Medical Association Congressional Science. Capitol Hill. Washington D.C. 303-342.
- 20.- Thomson L.A., Geraci J.R. (1986). Cortisol, aldosterone and leucocytes in the stress response of bottle nose dolphins, *Tursiops truncatus*. *Can J Fish Aquatic Sci*. 43: 1010-1016.
- 21.- Medway W., Geraci J.R., and Klein L.V. (1970). Hematologic response to administration of a corticosteroid in the bottle nose dolphin *Tursiops truncatus*, *J.Am Vet Med. Assoc*. 157: 563-565.
- 22.- Rosado A., Delgado N.M., Velázquez A., Aznar R., Martínez-Manautou. (1977). Cyclic changes in salivary activity of N-acetyl-B-D-glucosaminidase. *Am J Obstet Gynecol*. 128: 560-565.
- 23.- Davis R.H., and Balin H. (1972). Saliva glucosa, a useful criterion for determining the time of fertility in women. *Am J Obstet Gynecol*. 115: 287-292.
- 24.- Puskulian L. (1972). Salivary electrolytes changes during the normal menstrual cycle. *J Dent Res*. 51: 1212-1218
- 25.- Oster G., Yang Sh. L. (1972). Cyclic variation of sialic acid content in saliva. *Am J Obstet Gynecol*. 114: 190-195.
- 26.- Boyer K.G., France J.T. (1970). Alkaline phosphatase, arylsulfatase and  $\beta$ -Glucuronidase in saliva of cyclic women. *Int Fertil*. 21: 4-9.

- 27.- Sudakov K.V., Sosnovsky A. S., (1996), Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in brain regions after immobilization stress in august rats: Correlation with behavioral patterns. *Free Radicals in Brain Physiology and Disorders*. Academic Press. New York. 377-386.
- 28.- Liu J., Mori A. (1994). Involvement of reactive oxygen species in emotional stress: A hypothesis based on the immobilization stress-induced oxidative damage an antioxidant defense changes in rats brain, and the effect of antioxidant treatment with reduced glutathione, *Int J Stress Manage.* 1: 249-263.
- 29.- Sosnovsky A. S., Balashova T. S., Kubatiev A.A. (1993). Behavioral clusters and the rat brain antioxidant enzymes in immobilization stress. *Neurosciences.* 19: 141-149.
- 30.- Liu J., Wang X., Mori A. (1993). Immobilization stress induced antioxidant defense cahnges in rat plasma: Effect of treatment with reuced glutathione. *Int J Biochem.* 26: 511-517.
- 31.- Gardner H.W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids, *Free Radic Biol Med.* 7: 65-86.
- 32.- Esterbauer H., Scahur R.J., Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related alkehydes. *Free Radic Biol Med.* 11: 81-128.
- 33.- Ukhina T.V., Shegai M.M. (1993). Effect of hydrocortisone on the activity of skin lysosomal enzymes. *Bulletin of Exper Biol Med.* 115: 282-284.
- 34.- Weissman G., Thomas I., (1962). Dtudies om lysosomes. The effect of cortisone and enotoxin. *J Clin Invest.* 41: 1410. Abstracto.
- 35.- Ukhina T.V., Shegai M.M., Kalmagambetova G.ZH. (1996) Two mwchanims of progesterone action on the skin (Result of biochemical analysis), *Bull Exper Biol Med.* 122: 173-176.
- 36.- Schroeder J.P., Parker H.R., Grii S., Cates M.B. (1985). Effects of simulated transport on prostagladin levels in Tursiops truncatus. In *Proceedings, International Association for Aquatic Animal Medicine.* Tacoma WA. 16: 65.69.
- 37.- Fahmy D., Read G.F., Hiller S.G. (1975). Some observation on the detemination of cortisol in human plasma by radioimmunoassay using antisera against cortisol-3-BSA. *Steroids* 26: 267-273

- 38.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reactive. *J Biol Chem.* 193: 265-269.
- 39.- Fischman W.H., Bernfeld P. (1995). *Methods in enzymology*. Vol. 1 Acad. Press. New York. 262
- 40.- Yoshioka T., Kawada K., Shimada T., Mori M. (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol.* 135: 372-376.
- 41.- Chamberlain J. (1995). *The analysis of drugs in biological fluids*. 2<sup>nd</sup> Ed. Capitulo 2. CRC Press. New York 35-66.
- 42.- Elk-Nes K., Clark L.D. (1958). *J Clin Endocr.* 18: 764-769.
- 43.- Orth D.N., Island D.P., Liddle G.W. (1967). Experimental alteration of the circadian rhythm in plasma cortisol (17-OHCS) concentration in man. *J Clin Endocr.* 27: 549-555.
- 44.- Smith C.J., Norman R.L. (1987). Influence of gonads on cortisol secretion in female Rhesus macaques. *Endocrinology.* 121:2192-2198.
- 45.- Walker R.F., Riad-Fahmy D., Read G.F. (1978). Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or parotid saliva. *Clin Chem.*24: 1460-1463.
- 46.- Walker R.F., Fahmy D.R. Llewelin D.E.H. (1978). A direct radioimmunoassay for cortisol in parotid fluid and saliva. *Proc Soc Endocr.* 151<sup>st</sup> meeting. 77: 26p-27p.
- 47.- Kitay J.I. (1961). Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat. *Endocrinology.* 68: 818-823
- 48.- Buckingham J.C., Dohler K.D., Wilson C.A. (1978). Activity of the pituitary-adrenocortical system and thyroid gland during the estrous cycle of the rat. *J Endocrinol.* 78: 359-364
- 49.- Kitay J.I. (1963). Pituitary adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone replacement. *Endocrinology.* 73: 253-258
- 50.-Cohen I.R., Mann D.R. (1981). Influence of corticosterone on the response to gonadotropin-releasing hormone in rats. *Neuroendocrinology.* 32: 1-7
- 51.- Levshina I.P., Gulyaeva N.V. (1991). Dependence of the effect of acute stress on lateralization of lipid peroxidation products in the brain on behavioral typology of rat. *Bull Exp Biol Med.* 111: 736-738.

- 52.- Fried T. H. (1991). Symposium: Response of animals to stress: Behavioral aspects of stress. *J Dairy Sci.* 74: 292-303
- 53.- Solem J.H. (1996). Plasma corticosteroids in mice. *Scand J Clin Lab Invest.* 18: 1-6.
- 54.- Kitay J.I., Coyne M., Swygert N., Gaines K. (1971). Effects of gonadal hormones and ACTH on the nature and rates of secretion on adrenal steroids by the rats. *Endocrinology.* 89: 565-570.
- 55.- Fazekas A., Homoki J., Teller W. (1974). Influences of sex and age on cortisol content of peripheral tissues and gland in guinea pigs. *J Endocrinol.* 87: 455-459.
- 56.- Klosterman L.L., Murai J.T., Siiteri P.K. (1986). Cortisol levels, binding and properties of corticosteroids binding globulin in the serum of primates. *Endocrinology.* 118: 429-434.
- 57.- Zumoff B., Fukushima D.K., Weitzman E.D., Kream J., Hellman L. (1974). The sex differences in plasma cortisol concentration in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 39: 805-810.
- 58.- Smith C.J., Norman R.L. (1987). Circadian periodicity in circulating cortisol is absent after orchidectomy in Rhesus Macaques. *Endocrinology.* 121: 2186-2191.
- 59.- Villalobos J.A., Romero C., Tarrago M.R., Rosado A. (1997). Supplementation with chromium picolinate reduces the incidence of placental retention in dairy cows. *Can J Anim Sci.* 77: 329-330.
- 60.- Vial G.C., Estabefelt G.H., Franti C.E., Ling G.V. (1979). Influence of environment of adrenocortical response to ACTH stimulation in clinically normal dog. *Am J Vet Res.* 40: 919-921.
- 61.- Van Heerden J., Bertschinger H.J. (1982). Serum cortisol concentration in captive tamed and untamed black-backed jackals (*Canis mesomelas*) and translocated dogs. *J S Afr Vet Assoc.* 53: 235-237.
- 62.- Byung P.Y. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Fisiol Rev.* 74: 139-162.