

ARTÍCULOS ORIGINALES

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

Blood and oxidative stress parameters of oil-spill rehabilitated magallanic penguins

Carabajal, Eliana^{1,2*}, D'Amico Verónica¹, Medina Vanina A.²; Bertellotti Marcelo¹

¹Ecofisiología Aplicada al Manejo y Conservación de la Fauna Silvestre. CENPAT-CONICET. Boulevard Brown N° 2915 (9120), Puerto Madryn, Chubut. ²Laboratorio de Radioisótopos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

*carabajal@cenpat.edu.ar, carabajal@cenpat-conicet.gob.ar

Recibido: 7 de septiembre de 2015

Aceptado: 13 de agosto de 2016

Resumen. Los pingüinos de Magallanes son entre las aves marinas, la especie más afectada por la contaminación con petróleo en Chubut y Santa Cruz. Una de las consecuencias adversas de la exposición a hidrocarburos y otros contaminantes es el aumento de los niveles celulares de especies reactivas del oxígeno o estrés oxidativo, considerados herramientas útiles como biomarcadores del impacto de la exposición a contaminantes químicos peligrosos. El objetivo de este trabajo fue evaluar parámetros hematológicos y marcadores de estrés oxidativo durante la rehabilitación de tres pingüinos empetroados provenientes del Área Natural Protegida Punta Tombo, Chubut, Argentina. Se tomaron tres muestras de sangre por individuo: la primera muestra al arribo de los pingüinos al centro de rehabilitación, la segunda una semana después y una última muestra antes de ser liberados. Se obtuvieron la cantidad total de leucocitos, la razón heterófilos/linfocitos, el hematocrito y las concentraciones de glucosa y de proteínas totales. Se analizó la actividad de la enzima catalasa, responsable de la degradación del peróxido de hidrógeno, los niveles de tioles totales no proteicos y el daño a lípidos evaluando las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, como indicadores de estrés oxidativo. El estudio se complementó con la obtención del peso de los pingüinos. En general, los parámetros medidos, aumentaron o se mantuvieron constantes desde la primera toma de muestra hasta la última. Si bien algunas de las variables para cada pingüino se comportaron diferentes durante el tratamiento, en general se observó una tendencia a normalizarse hacia el momento de su liberación. Se concluye que los pingüinos se liberaron en buen estado físico luego de la rehabilitación.

Palabras clave: Parámetros hematológicos; Estrés oxidativo; Pingüinos de Magallanes; Contaminación por petróleo.

Abstract. Magallanic penguins are among the most affected seabirds by oil contamination in Patagonia. Hydrocarbons and other pollutants cause an increase in the cellular levels of reactive oxygen species that lead oxidative stress and in this way, the evaluation of oxidative stress parameters could be useful tools as biomarkers to evaluate the exposure to hazardous chemical contaminants. The aim of the present work was to evaluate hematological parameters and oxidative stress biomarkers during the rehabilitation of three oil-spill penguins from Punta Tombo Natural Protected Area in Chubut, Argentina. Three blood samples were taken from each individual, the first sample was obtained at arrival of penguin to the rehabilitation center, the second one was the following one week and last sample was taken before animals were freed. Hematocrit, white blood cell count, heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress, and concentrations of glucose and total proteins were determined. The thiobarbituric acid reactive species, a well-established method for monitoring lipid peroxidation, the activity of catalase enzyme (involved in the catabolism of hydrogen peroxide) and the thiol levels were evaluated as oxidative stress indicators. In general, the measured parameters remained constant or increased their values from the first to the last blood sampling. While some of the variables for each penguin behaved differently during treatment, generally they tended to normalize when penguins were released. We conclude that penguins were released in good physical condition after rehabilitation.

Key words: Hematological parameters; Stress Oxidative; Magallanic penguins; Oil pollution.

Introducción

Los pingüinos de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) son entre las aves marinas de la Patagonia, la especie más afectada por la contaminación con petróleo y otros hidrocarburos. Estos pingüinos recorren grandes dis-

tancias nadando en la superficie durante sus viajes de alimentación o durante sus migraciones, muchas veces coincidiendo con las áreas de explotación y tránsito de buques petroleros, resultando especialmente suscepti-

bles al empetrolamiento (Bertellotti 2013). Las aves empetroladas pierden la capacidad aislante de su plumaje y en consecuencia, no pueden ingresar al mar para alimentarse. También se intoxican por la ingestión directa del petróleo cuando intentan limpiarse las plumas (Wiese y Ryan 2003; Bertellotti 2013). La exposición a contaminantes como lo son los hidrocarburos provoca en los animales graves daños fisiológicos (Harvey y col. 1999; Golet y col. 2002; Laffon y col. 2006). Se han documentado alteraciones hematológicas (Anselstetter y Heimpel 1986; Canepuccia y col. 1989, Balseiro y col. 2005), daños tóxicos que afectan al hígado y riñones (Golet y col. 2002; Alonso Álvarez y col. 2007), daños genotóxicos que afectan a los cromosomas somáticos (Custer y col. 2000), efectos inmunosupresivos (White y col. 1985) y daños inmunológicos (Auffret y col. 2004).

El petróleo y otros contaminantes una vez ingeridos por las aves, son absorbidos en el intestino y luego transportados hasta el hígado, donde una serie de sistemas enzimáticos los modifican estructuralmente para favorecer su eliminación. La acción de estos sistemas enzimáticos genera diferentes sustancias prooxidantes conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO). El aumento de las ERO como consecuencia del desbalance entre antioxidantes y prooxidantes es conocido como estrés oxidativo (Costantini 2008) y es considerado una herramienta de gran utilidad en el monitoreo ambiental. El objetivo de este trabajo fue evaluar algunos parámetros hematológicos y marcadores de estrés oxidativo durante la rehabilitación de tres pingüinos empetrolados provenientes del Área Natural Protegida Punta Tombo, Chubut, Argentina.

Materiales y métodos

Durante la primavera de 2013, tres pingüinos de Magallanes con signos de empetrolamiento leve que arribaron a la colonia reproductiva de Punta Tombo (44° 04' S y 65° 11' O), fueron remitidos al centro de rehabilitación perteneciente a la Dirección de Fauna y Flora Silvestre de Chubut. Allí fueron alimentados, lavados y rehabilitados para su posterior liberación en el mismo sitio donde fueron encontrados. A cada pingüino se le tomaron tres muestras de sangre (entre 1,5 y 3 ml) de la vena metatarsial, durante su estadía en el centro de rehabilitación. La primera muestra fue tomada cuando las aves ingresaron al

centro (pingüino empetrolado) el 26/09/2013; la segunda fue obtenida una semana más tarde cuando comenzó el proceso de lavado y la tercera fue tomada 22 días después, cuando el plumaje de cada uno ya estuvo completamente limpio antes de ser liberado (pingüino rehabilitado). A cada pingüino se le registró el peso a su entrada y a lo largo de la rehabilitación.

Análisis hematológicos

Se prepararon frotis sanguíneos, se fijaron con alcohol etílico y se tiñeron con Tinción 15 (Biopur). Bajo microscopio óptico se estimó la cantidad total de leucocitos (LT) en 10 campos visuales con una densidad homogénea de células (Hale y Briskie 2007). Se contaron y diferenciaron los tipos celulares (basófilos, eosinófilos, heterófilos, linfocitos y monocitos) hasta llegar a los 100 leucocitos en (Campbell 1995). Se calculó la razón heterófilos/linfocitos (H/L), conocida como un indicador de estrés fisiológico (Davis y col. 2008).

Se midió el hematocrito, la glucosa en sangre (GLU) mediante el uso de tiras reactivas (Accu-Chek Performa, Roche) y en plasma las proteínas totales (PT) utilizando un refractómetro veterinario (ZGRC-200, Científica Schönfeld).

Parámetros de estrés oxidativo

El análisis de la enzima catalasa y la evaluación de los niveles de tioles totales no protéicos se realizaron en los glóbulos rojos. Éstos fueron lavados con solución fisiológica y luego diluidos en solución de ácido acético 1 mM y $MgSO_4$ 4 mM y centrifugados a 3000 rpm durante 30 minutos. Se utilizó el sobrenadante para realizar las determinaciones. Se evaluó la actividad de la enzima catalasa midiendo la velocidad de descomposición de H_2O_2 a 240 nm por espectrofotometría. Los resultados se normalizaron de acuerdo al contenido de proteínas, determinado por el ensayo de Bradford. Se consideró una unidad de catalasa como la desaparición de 1 μ mol de H_2O_2 /minuto (ϵ 43.6 $M^{-1}cm^{-1}$). Los blancos de reacción se prepararon reemplazando la muestra por el tampón utilizado.

Se determinó la concentración de los tioles totales no protéicos mediante la evaluación de la capacidad de los grupos sulfhidrilo (-SH) de reducir el ácido 5-5'ditiobis-nitrobenzónico (DTNB), tanto en plasma como en

los glóbulos rojos. El plasma y los glóbulos rojos (1 µl en cada caso) fueron homogeneizados con 1 ml HClO₄, centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm y neutralizados con Na₃PO₄ (0,44 M) hasta un pH 7, previo agregado de 50 µl DTNB 6 mM en NaHCO₃ 0,5 % p/v. Se registró la absorbancia a 412 nm luego de 30 segundos (ϵ 13.6 mM⁻¹ cm⁻¹). Como controles positivos se utilizaron extractos proteicos de hígado. Los blancos se prepararon reemplazando la muestra por el tampón utilizado. Los resultados de tioles totales se expresaron como mmol/L de plasma y mmoles/mg de proteínas para los glóbulos rojos.

Se analizó la peroxidación lipídica en plasma, determinando el malonilaldehído (MDA). Éste al reaccionar con dos moléculas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), bajo condiciones de acidez y temperatura controlada a 100 °C, forma un cromógeno rojo (MDA-TBA). La muestra de plasma se diluyó previamente con la mezcla de reacción que contienen ácido tricloro acético 20 %, p/v, ácido tiobarbitúrico 0,7 % p/v y HCl 4 N. La mezcla se hirvió por una hora y se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos. Se midió la absorbancia del ácido tiobarbitúrico (TBARS), en el sobrenadante, en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 535 nm (ϵ 1.56 x 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹). Como blanco se utilizó la mezcla de reacción hervida por una hora y centrifugada a 3000 rpm en ausencia de muestra. Los resultados se expresaron como µM de TBARS.

Consideraciones éticas

Atendiendo a la responsabilidad ética y social que compete a la actividad científica y tecnológica, este estudio no comprometió ni afectó los derechos humanos, ni fue causa de un eventual daño al medio ambiente, a los animales y/o a las generaciones futuras. El estudio contó con los permisos otorgados por las autoridades de aplicación de la provincia de Chubut (Dirección de Fauna y Flora Silvestre, Subsecretaría de Recursos Naturales, Ministerio de Desarrollo Territorial y Sectores Productivos, y Subsecretaría de Conservación y Áreas Protegidas, Secretaría de Turismo). Este trabajo además está acorde con todos los requisitos éticos, legales y jurídicos, establecidos en las normas bioéticas nacionales (Disposición ANMAT 5330/97) e internacionales (Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones, Declaración

Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO, del 11/11/1997).

Resultados

El pingüino 1 fue un macho que ingresó con escasas manchas de petróleo y con sangre seca en sus plumas, y no registró heridas. El análisis hematológico mostró que, entre la primera y segunda toma de muestras disminuyeron los LT y luego aumentaron en la tercera toma (*Figura 1 e*). El hematocrito y la relación H/L se mantuvieron constantes durante las tres tomas de sangre (*Figura 1 c y f*). La GLU disminuyó sus valores entre la primera y segunda toma, pero aumentaron sus valores en la tercera (*Figura 1 b*). Los niveles de PT aumentaron entre la primera y segunda toma de muestras y luego disminuyeron en la tercera toma (*Figura 1 d*). El peso del individuo fue aproximadamente constante desde su ingreso hasta la tercera toma (*Figura 1 a*). El estudio de los parámetros de estrés oxidativo indicó un aumento de la actividad de la enzima catalasa (*Figura 2 b*), de los niveles de tioles en plasma (*Figura 2 c*) y en glóbulos rojos (*Figura 2 d*), y un aumento de los niveles TBARS (*Figura 2 a*) en la segunda toma respecto de la primera. Mientras que, en la tercera toma la actividad de la enzima catalasa y los tioles en plasma mantuvieron sus niveles (*Figura 2 b y c*). Los niveles de tioles en glóbulos rojos y los TBARS disminuyeron (*Figura 2 d y a*).

El pingüino 2 fue una hembra que ingresó con escasas manchas de petróleo y sin registrar heridas. Los LT aumentaron desde la primera y hasta la tercera toma de muestras (*Figura 3 e*) en tanto que la relación H/L se mantuvo constante (*Figura 3 f*). El hematocrito disminuyó considerablemente desde la primera hasta la tercera toma de muestra (*Figura 3 c*), mientras que la GLU permaneció constante durante los tres muestreos (*Figura 3 b*). Los valores de PT aumentaron desde la primera hasta la tercera toma de muestras (*Figura 3 d*). El peso aumentó entre la primera y segunda toma y luego se mantuvo constante (*Figura 3 a*). Tanto la actividad de la enzima catalasa como los niveles de tioles en plasma variaron muy poco a lo largo de los muestreos (*Figura 4 b y d*). Los tioles en glóbulos rojos aumentaron considerablemente entre la primera y segunda toma, pero luego disminuyeron por debajo del valor inicial en el tercer muestreo (*Figura 4 e*). Para TBARS por ser escasa la

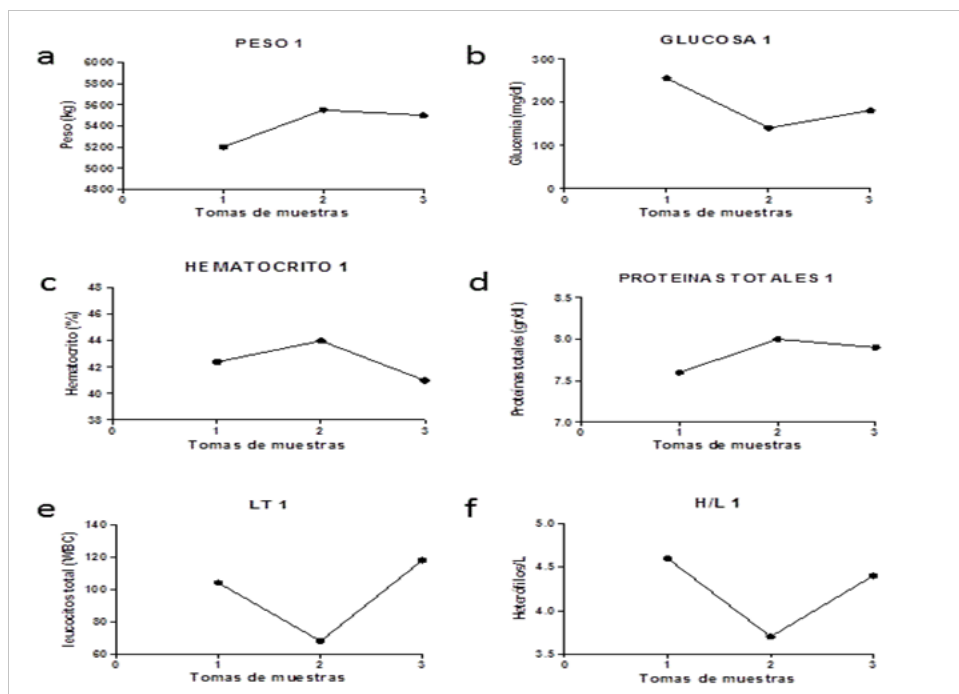


Figura 1. Parámetros morfométricos y hematológicos en Pingüino de Magallanes 1. a) Los pesos de los animales se indican en gramos (gr). b) Concentración de glucosa (mg/dl) en plasma de los animales. c) Hematocritos (%) en sangre entera. d) Proteínas totales (gr/dl) en plasma. e) Leucocitos totales evaluados en frotis de sangre f) Razón.

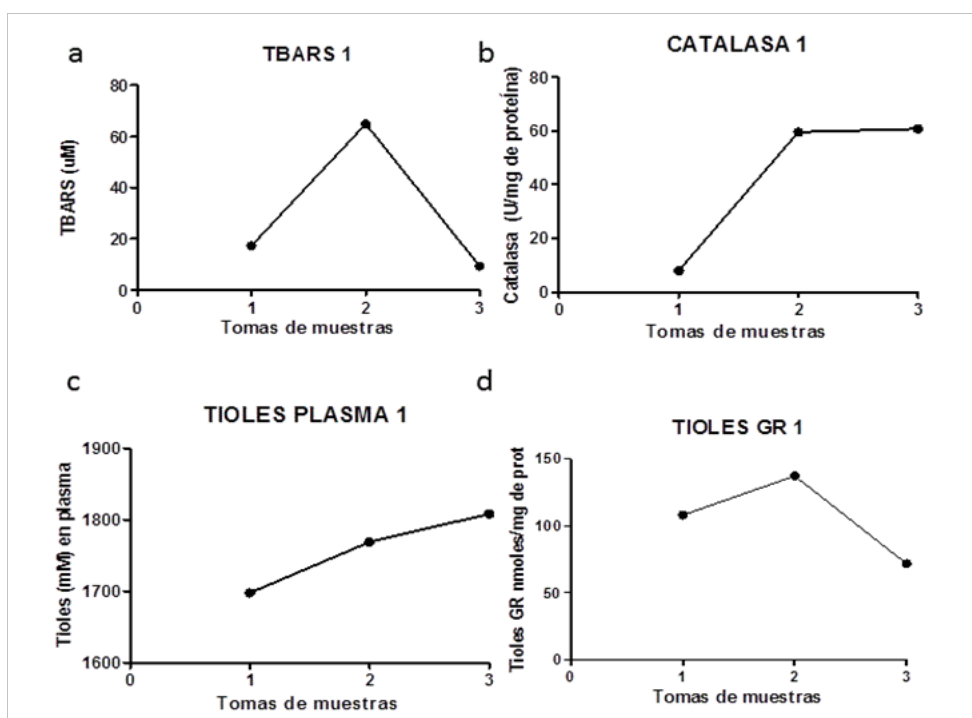


Figura 2. Parámetros de estrés oxidativo en Pingüino de Magallanes 1. a) Niveles de TBARS en plasma (µM). b) Actividad de la enzima catalasa (U/mg) en glóbulos rojos. c) Niveles de tioles totales no proteicos en plasma (mM). d) Niveles de tioles totales no proteicos en glóbulos rojos (mmoles/mg de proteína).

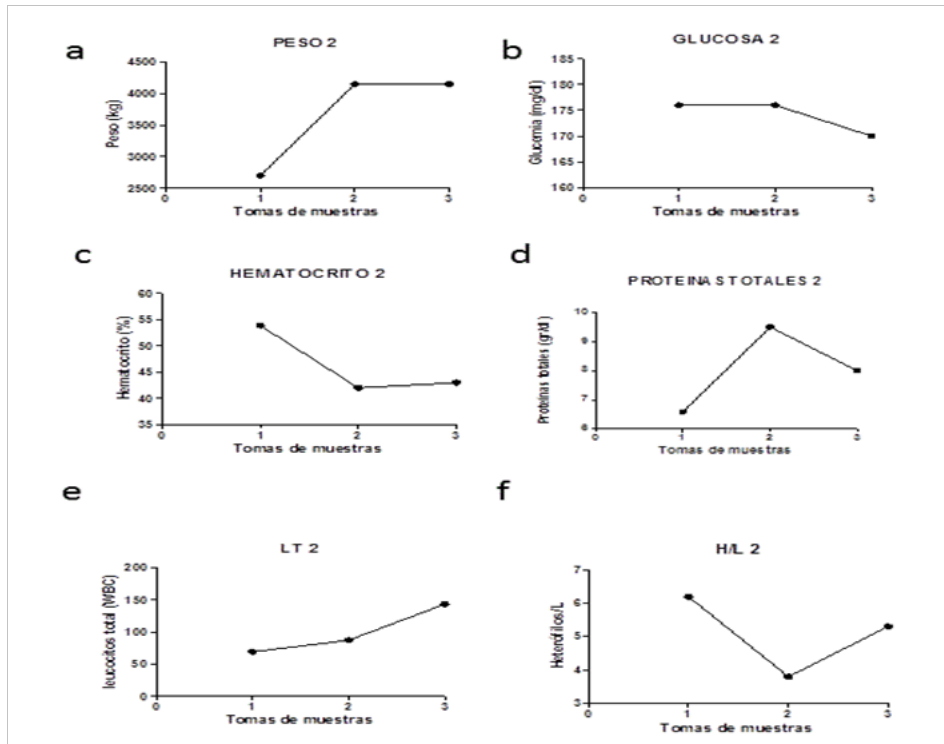


Figura 3. Parámetros morfométricos y hematológicos en Pingüino de Magallanes 2. a) Los pesos de los animales se indican en gramos (gr). b) Concentración de glucosa (mg/dl) en plasma de los animales. c) Hematocritos (%) en sangre entera. d) Proteínas totales (gr/dl) en plasma. e) Leucocitos totales evaluados en frotis de sangre f) Razón heterófilos/linfocitos (H/L).

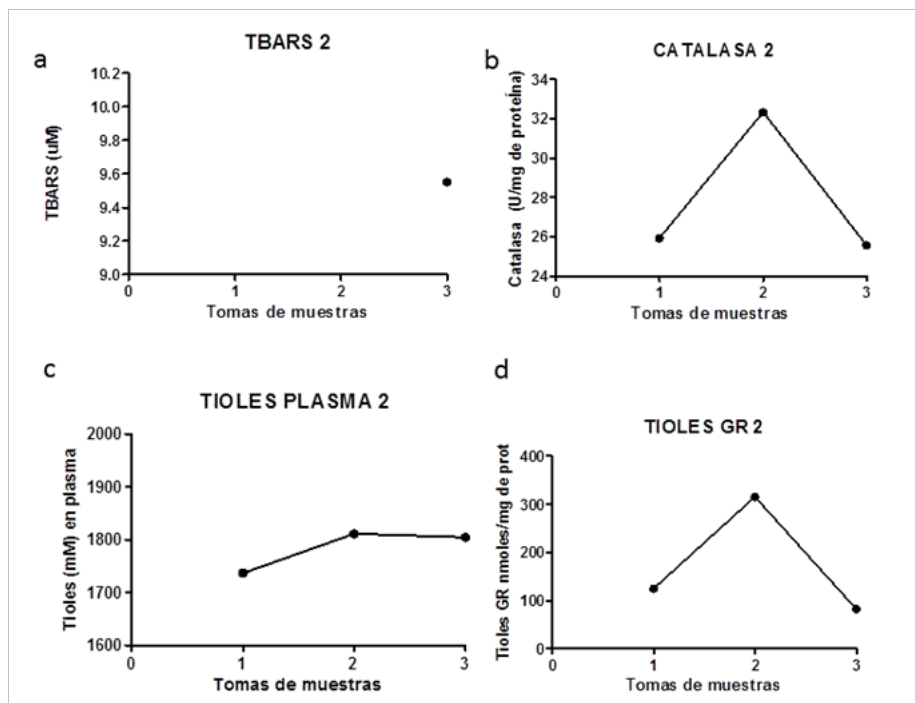


Figura 4. Parámetros de estrés oxidativo en Pingüino de Magallanes 2. a) Niveles de TBARS en plasma (µM). b) Actividad de la enzima catalasa (U/mg) en glóbulos rojos. c) Niveles de tioles totales no proteicos en plasma (mM). d) Niveles de tioles totales no proteicos en glóbulos rojos (mmoles/mg de proteína).

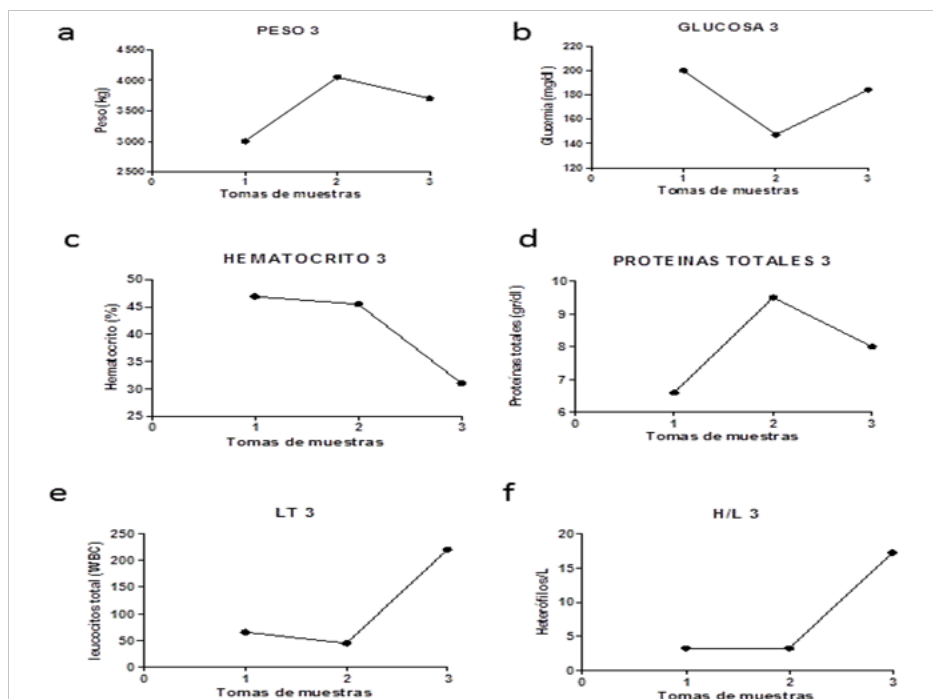


Figura 5. Parámetros morfométricos y hematológicos en Pingüino de Magallanes 3. a) Los pesos de los animales se indican en gramos (gr). b) Concentración de glucosa (mg/dl) en plasma de los animales. c) Hematocritos (%) en sangre entera. d) Proteínas totales (gr/dl) en plasma. e) Leucocitos totales evaluados en frotis de sangre f) Razón heterófilos/linfocitos (H/L).

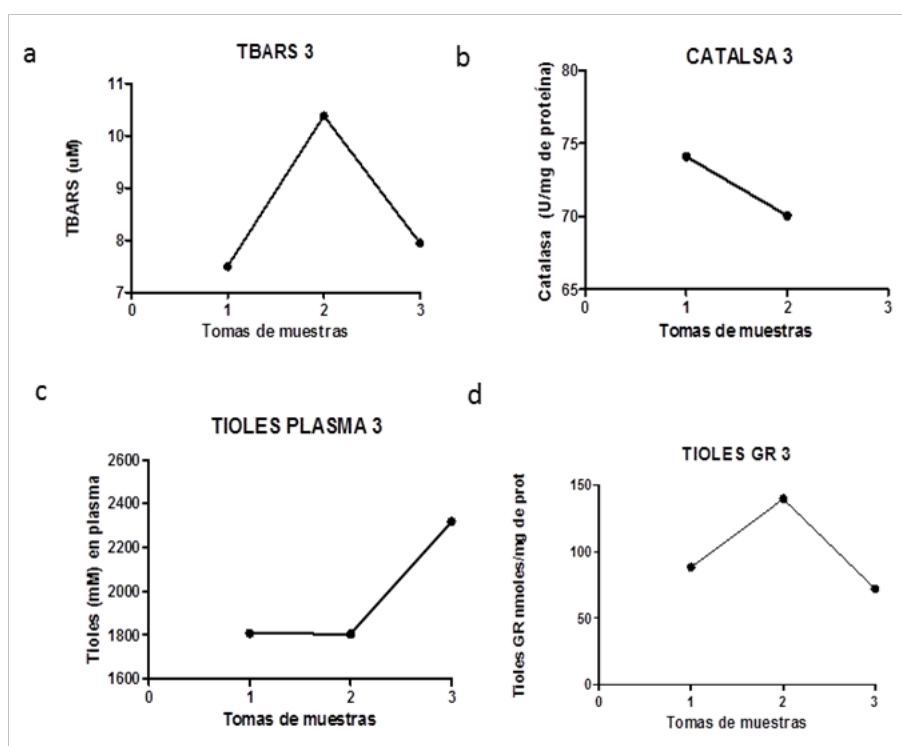


Figura 6. Parámetros de estrés oxidativo en Pingüino de Magallanes 3. a) Niveles de TBARS en plasma (μM). b) Actividad de la enzima catalasa (U/mg) en glóbulos rojos. c) Niveles de tioles totales no proteicos en plasma (mM). d) Niveles de tioles totales no proteicos en glóbulos rojos (nmoles/mg de proteína).

muestra, solo se registró el valor en la tercera toma de muestra (Figura 4 a).

El tercer pingüino fue una hembra que presentó una importante mancha de petróleo en el cuello, sin registrarse heridas. Los valores de LT y de GLU disminuyeron entre la primera y la segunda toma y luego aumentaron en la tercera (Figura 5 e y b), mientras que H/L aumentó en la tercera toma (Figura 5 f). El hematocrito mostró valores similares en los tres muestreos (Figura 5 c). Las PT mostraron un patrón inverso aumentaron en la segunda toma y luego disminuyeron su valor (Figura 5 d). El peso aumentó entre la primera y la segunda toma y luego se mantuvo constante hasta la tercera (Figura 5 a). La actividad de los TBARS y de la catalasa mostraron valores similares en las tres tomas (Figura 6 a y b). Los tioles en plasma fueron similares entre la primera y la segunda toma, pero en la tercera, sus niveles aumentaron considerablemente (Figura 6 c). Los tioles en glóbulos rojos aumentaron sus niveles entre la primera y la segunda toma, y luego disminuyeron en la tercera (Figura 6 d).

Discusión y conclusión

A su arribo, en la primera toma de muestra, los pingüinos mostraron mayores valores de PT y menores niveles de GLU, en comparación con los valores reportados para otros pingüinos de Magallanes empetrolados encontrados en la costa de Mar del Plata a 1000 km aproximadamente de Punta Tombo (Tabla 1).

Canepuccia y col. (1999) reportaron valores de PT y GLU de 4,7 gr/dl y 242 gr/dl respectivamente mientras que, el valor obtenido en este trabajo fue de 7 gr/dl para PT y de 222 gr/dl para GLU (Tabla 1). Esto podría deberse a que el grado de contaminación con petróleo de los pingüinos en este estudio fue menor que en los pingüinos reportados por Canepuccia y col. (1999). De esta manera, la inversión energética en forma de glucosa, que es el carbohidrato más importante como fuente de energía (Berthold 1996), podría ser mayor en los pingüinos con mayor grado de empetrolamiento. Además, el peso de los pingüinos empetrolados que arribaron a Punta Tombo, fue similar al peso normal (entre 3,5 y 4 kg) reportado para

Tabla 1. Valores de parámetros hematológicos y de estrés oxidativo de pingüinos de Magallanes.

Se muestra el promedio \pm el desvío estándar y el tamaño muestral (N) para pingüinos de Magallanes. Los parámetros medidos fueron leucocitos totales (LT), la razón heterófilos/linfocitos (H/L), hematocrito (HTO), glucosa (GLU), proteínas totales (PT), actividad de la catalasa (AC), niveles de tioles en plasma (TP) y en glóbulos rojos (TGR) y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Parámetros	1ra toma de muestra	2da toma de muestra	3ra toma de muestra	Pingüinos considerados sanos
LT	85,8 \pm 25,8 (N=3)	66,7 \pm 21,0 (N=3)	160,3 \pm 53,2 (N=3)	32,7 \pm 0,3 (N=30) ^a
H/L	4,7 \pm 0,1 (N=3)	3,6 \pm 0,3 (N=3)	9,0 \pm 7,2 (N=3)	1,1 \pm 0,1 (N=30) ^a
HTO	46,4 \pm 5,6 (N=3)	43,8 \pm 1,8 (N=3)	38,3 \pm 6,4 (N=3)	41,5 \pm 3,8 (N=32) ^b
GLU	222 \pm 48,1 (N=3)	154,7 \pm 18,7 (N=3)	178,3 \pm 7,4 (N=3)	142,9 \pm 3,5 (N=32) ^b
PT	7,0 \pm 0,8 (N=3)	8,2 \pm 1,2 (N=3)	7,4 \pm 0,9 (N=3)	6,9 \pm 0,4 (N=32) ^b
AC	35,9 \pm 34,2 (N=3)	53,9 \pm 19,5 (N=3)	43,2 \pm 24,9 (N=3)	72,5 \pm 30,6 (N=26) ^b
TP	1740,3 \pm 44,7 (N=3)	1805,7 \pm 34,3 (N=3)	1976,8 \pm 295,5 (N=3)	1706,5 \pm 160,1 (N=17) ^b
TGR	106,9 \pm 18,1 (N=3)	197,4 \pm 102,0 (N=3)	75,3 \pm 5,9 (N=3)	38,6 \pm 11,2 (N=26) ^b
TBARS	12,4 \pm 6,9 (N=3)	37,7 \pm 38,6 (N=3)	8,9 \pm 0,9 (N=3)	11,0 \pm 6,5 (N=19) ^b

^a Datos extraídos de D'Amico y col. 2014

^b Datos inéditos de Carabajal y col.

los pingüinos de Magallanes (Bertellotti 2013). En este sentido, los individuos de este estudio no estarían manifestando problemas nutricionales tales como los descritos en Canepuccia y col. (1999), lo que también se refleja en los valores más altos de PT (*Tabla 1*).

Por otro lado, a su ingreso los tres pingüinos empetrolados mostraron valores hematológicos (excepto para PT) y de estrés oxidativo (excepto al actividad de enzima catalasa) mayores en comparación con pingüinos de Magallanes muestreados en una colonia ubicada a 352 km al norte de Punta Tombo, la colonia San Lorenzo en la Península Valdés (*Tabla 1*; Carabajal datos inéditos; D'Amico y col. 2014). Los valores de los pingüinos de la colonia San Lorenzo, se pueden considerar de referencia para la especie en la zona de Patagonia, ya que no presentaron lesiones externas ni manchas de contaminantes en la piel (*Tabla 1*). En este sentido, se podría suponer que el costo energético que implica la contaminación, por mínima que sea, es alta para los animales. Esto se manifiesta en que se consumen las reservas energéticas en forma de GLU y se invierte en inmunidad, ya que la producción de LT en sangre fue mayor (*Tabla 1*). Finalmente, la situación se traduce en un mayor estrés fisiológico que se refleja en un índice H/L mayor en los pingüinos empetrolados (*Tabla 1*).

Los valores de PT fueron similares en los pingüinos empetrolados y en los pingüinos de la colonia de San Lorenzo (*Tabla 1*). Esto puede deberse a que las PT reflejan el almacenamiento de nutrientes que se incorporan con el alimento (Brown 1996) y, como se explicó previamente, los pingüinos no se encontrarían en un estado nutricional pobre.

En relación a los parámetros de estrés oxidativo evaluados, los niveles de TBARS de los pingüinos empetrolados resultaron mayores mientras que los niveles de actividad de catalasa fueron menores comparados con los valores de los pingüinos de la colonia San Lorenzo (*Tabla 1*). Las ERO poseen elevado poder oxidante, afectando membranas celulares y macromoléculas. La determinación de TBARS en plasma se emplea como indicador directo del daño celular y de la peroxidación lipídica producida por el aumento de las ERO, que puede asociarse a una reducción de las actividades de las enzimas antioxidantes como catalasa (Ortiz de Urbina y col. 2004). Por su parte, los niveles de tioles, que actúan como antioxidantes, fueron mayores en los

pingüinos empetrolados que en los pingüinos de la colonia de San Lorenzo (*Tabla 1*). El glutatión es el tiol no proteico más abundante y ayuda a proteger las células de las ERO como los radicales libres y los peróxidos (Chihuailaf y col. 2002). De esta manera el mayor nivel de tioles en los pingüinos empetrolados podría deberse a un intento de contrarrestar el estrés oxidativo.

Desde la entrada al centro y luego del lavado, donde los tres pingüinos sufrieron alteraciones en algunos de los parámetros medidos, los valores tendieron a normalizarse hacia el final de la rehabilitación. Entre la segunda y la tercera toma de muestras, los valores de la GLU, las PT, la actividad de la catalasa, los tioles en glóbulos rojos y los niveles de TBARS, mostraron una disminución tendiente a acercarse a los valores considerados normales para esos parámetros (*Tabla 1*; Carabajal datos inéditos; D'Amico y col. 2014). Sin embargo, los valores de LT y el índice H/L fueron muy bajos en la segunda toma y luego aumentaron en la tercera. Esto puede deberse al estrés producido por el lavado de los pingüinos, que sucedió entre la segunda y tercera toma de muestras.

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

Agradecimientos: agradecemos al personal de la Dirección de Flora y Fauna Silvestre de la Provincia de Chubut por su valiosa contribución para la toma de muestras de los pingüinos durante su rehabilitación. Agradecemos a María Belén Argüelles por sus aportes al manuscrito.

Bibliografía citada

Alonso Álvarez C., Munilla I., López M., Velandro A. Sublethal toxicity of the Prestige oil spill on yellow-legged gulls. *Environ Int.* 2007;54:773-781.

Anselstetter V., Heimpel H. Acute hematotoxicity of oral benzo(a)pyrene: the role of the Ah locus. *Acta Haematol.* 1986;76:217-223.

- Auffret M., Duchemin M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Moraga D., Marhic A. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the "Erika" oil spill. *Aquat Living Resour.* 2004;17:297-302.
- Balseiro A., Espí A., Márquez I., Pérez V., Ferreras M.C., García Marín J.F., Prieto J.M. Pathological features in marine birds affected by the Prestige's oil spill in the North of Spain. *J Wildl Dis.* 2005;41:371-378.
- Bertellotti M. Pingüino de Magallanes, embajador de la Patagonia. Ed. Vázquez Mazzini. Buenos Aires. 2013. ISBN: 978-987913242-5.
- Berthold P. Control of bird migration. Eds. Chapman and Hall. London. 1996. ISBN 978-0-412-36380-1.
- Brown M. Assessing Body Condition in Birds. En: *Current Ornithology*. Nolan Jr. V, Ketterson, E.D. Eds. New York: Plenum Press; 1996;13(3):67-135.
- Campbell T.W. *Avian Hematology and Cytology*. Iowa State University Press Ames Iowa. 1995.
- Canepuccia A.D., Meligeni C.D., Verdun R. Estudios sobre los efectos de la contaminación por petróleo en sangre del pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*). *Actas de las XIX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario*. 1999.
- Chihuailaf R.H., Contreras P.A., Wittwer F.G. Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. *Vet Mex.* 2002; 33(3):264-283
- Código de Núremberg. Tribunal Internacional de Núremberg, 1947. Traducción adaptada de Mainetti J.A. 1989. *Ética médica*, Quirón, La Plata, Argentina.
- Costantini D. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecol Lett.* 2008;11:1238-1251.
- Custer T.W., Custer C.M., Hines R.K., Sparks D.W. Trace elements organochlorines, polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins and furans in lesser scaup wintering on the Indiana Harbor Canal. *Environ Pollut.* 2000;110:469-482.
- D'Amico V.L., Bertellotti M., Diaz J.I., Coria N., Vidal V., Barbosa A. Leucocyte levels in some antarctic and non-antarctic penguins. *Ardeola.* 2014;61(1):145-152.
- Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates. A review for ecologists. *Funct Ecol.* 2008;22:760-77.
- Declaración de Helsinki y sus modificaciones, Declaración Universal sobre Genoma Humano y Derechos Humanos aprobada por la Conferencia General de la UNESCO, del 11/11/1997). *Bioética*. El Desafío de una Declaración Universal. Ministerio de justicia y derecho humanos de la Nación Argentina. [en línea] Septiembre de 2007. [Consulta 15 octubre 2015]. Disponible en: http://www.jus.gob.ar/media/1038872/publicacion_08-dhpt-bioetica_desafio.pdf.
- Disposición ANMAT 5330/97 (con las modificaciones de las Disp. ANMAT N° 690/ 2005 y 2124/200). [en línea]. [Consulta 15 octubre 2015]. Disponible en <http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/ccis/files/2012/08/Disp5330.pdf>.
- Golet G.H., Seiser P.E., McGuire A.D., Roby D.D., Fischer J.B., Kuletz K.J., Irons D.B., Dean T.A., Jewett S.C., Newman S.H. Long-term direct and indirect effects of the Exxon Valdez oil spill on pigeon guillemots in Prince William Sound, Alaska. *Mar Ecol Prog Ser.* 2002;241:287-304.
- Hale K.A., Briskie J.V. Decreased immunocompetence in severely bottlenecked population of an endemic New Zealand bird. *Anim Conserv.* 2007;10:2-10.
- Harvey J.S., Lyons T.S., Page T.S., Stewart C., Parry J.M. An assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in selected invertebrate and vertebrate species. *Mutat Res.* 1999;441:103-114.
- Laffon B., Fraga-Iriso R., Pérez Cadahía B., Méndez J. Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil contaminated birds. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:1714-1723.

Ortiz de Urbina J.J., Jorquera F., Culebras J., Villares C., González-Gallego J., Tuñón M.J. Effects of glutamine on antioxidants systems and hepatic detoxification in rats: influence of formulation. *Nutr Hosp.* 2004;2:73-82.

White K.L.J., Lysy H.H., Holsapple M.P. Immunosuppression by polycyclic aromatic hy-

drocarbons: a structure-activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacology.* 1985;9:155-164.

Wiese F., Ryan P. The extent of chronic marine oil pollution in southeastern Newfoundland waters assessed through beached bird surveys 1984–1999. *Mar Pollut Bull.* 2003;46:1.