







VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA   
Facultat de Medicina i Odontologia  
Departamento de Farmacología

**Dr. D. Julio Cortijo Gimeno**, *Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia.*

**Certifica:**

*Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Teresa Lorenzo Bermejo, con el título:*

***“Fisiopatología del síndrome descompresivo en tortugas marinas”***, *ha sido realizado bajo mi dirección y reúne todos los requisitos necesarios para optar al grado de doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.*

*Y para que así conste, firmo el presente certificado en Valencia,*

*Marzo de 2018.*



Dr. Julio Cortijo Gimeno





VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA (Q 大)  
Facultat de Medicina i Odontologia  
Departamento de Farmacología

**Dr. D. José Luis Ortiz Belda**, *Profesor titular del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia. Director de Sección Departamental: Farmacología.*

**Certifica:**

*Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Teresa Lorenzo Bermejo, con el título:*

***“Fisiopatología del síndrome descompresivo en tortugas marinas”***, *ha sido realizado bajo mi dirección y reúne todos los requisitos necesarios para optar al grado de doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.*

*Y para que así conste, firmo el presente certificado en Valencia,  
Marzo de 2018.*

Dr. José Luis Ortiz Belda



## **AGRADECIMIENTOS**

*Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible.*

*En primer lugar, a mis directores:*

*Al Dr. Julio Cortijo, por darme la oportunidad de aprender y desarrollarme en su grupo de investigación, por su experiencia, sus consejos y su exigencia que han hecho que este trabajo de investigación haya sido posible.*

*Al Dr. José Luis Ortiz, para el que no hay palabras suficientes. Gracias por haber puesto tanta ilusión desde el principio con este proyecto tan diferente, por haber creído siempre en mí, por tu paciencia y ayuda infinita. Siempre con una sonrisa y siempre con un buen consejo.*

*A mis más que compañer@s del laboratorio, gracias por vuestra paciencia con la chica de los delfines. Han sido unos años que recordaré siempre con una gran alegría porque al final me llevo grandes amigos de esta experiencia. A Bea, por estar siempre y saber que esto solo acaba de empezar. Dentro de unos años nos reiremos de mis inmunos o tu pasión por los ratones y, allí estaré para ver lo lejos que llegas. A Adela, no solo por enseñarme sino por escucharme siempre con una sonrisa. Anselm, millones de gracias por tus horas dedicadas a mis tortugas y delfines con esa curiosidad investigadora que espero no pierdas nunca. Luci, por repetir una y otra vez nuestras "jaimitadas" aunque ahora sea a distancia. A Sonia C., Inés, Pilar, Martín, Alfonso, Sonia G. y Pili por vuestra ayuda en el laboratorio y todas las risas compartidas. Y a ti, Milara, nunca interpretar unos resultados ha sido tan divertido y siempre has estado dispuesto a ayudarme con tu gran humor.*

*Al Oceanográfico de Valencia, por permitirme trabajar en lo que más me gusta. A Daniel, porque sin tu cabeza esta tesis no habría sido posible, como bien me enseñaste hace años las cosas salen con optimismo e ilusión. A José Luis Crespo, por meterme de lleno en su mundo de tortugas y compartir su pasión conmigo, jamás olvidaré ese primer varamiento juntos (neopreno al revés incluido) ni todos los buenos momentos que han continuado desde entonces. A Andreas, por la financiación, por permitirme*

*combinar mi investigación en tortugas marinas con la investigación en mamíferos marinos y por enseñarme. A Teresa y Moni por estos años tan bonitos.*

*Y sobre todo a mi familia de investigación: Ana, Salva y Ali no sé qué habría hecho sin vosotros. Y en especial a Chelo, por no dejarme caer, por estar siempre incondicional y además de todo, por el gran apoyo que has sido estos últimos meses.*

*A mis amigos, Carlos y Vicente por estar siempre cerveza en mano dispuestos a arreglar el planeta conmigo y, junto Rosi y Juan, ser mi familia valenciana. A mis amigos de Madrid, a mis veterinarias favoritas, a mis quetzales y a mis vzs porque la distancia no es nada y habéis creído siempre en mí y os habéis sentido orgullosos. A Ana, por devolverme la ilusión trabajando con sus focas y estar siempre ahí, gracias sugar.*

*A Nacho por acompañarme en esta aventura y aguantarme cuando más lo he necesitado, por no dejarme tirar la toalla y por formar el mejor equipo que jamás habría imaginado.*

*Por último, a mi familia. A Luis por enseñarme desde pequeña su pasión por la ciencia. A mi hermano Pablo por sentirse orgulloso de mi trabajo y tener en él más que un hermano un buen amigo. Y a mis padres, todo lo que soy os lo debo a vosotros, sois un referente para mí. Sin vuestros valores y la educación que me habéis dado nada de esto habría sido posible.*

*Gracias a todos por haber hecho de esta tesis una realidad.*



Lo importante es no dejar nunca de hacer preguntas.  
No perder jamás la bendita curiosidad".

*Albert Einstein*



## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	15
CAPÍTULO 1.....	17
ANTECEDENTES: ENFERMEDAD DESCOMPRESIVA EN MEDICINA HUMANA.....	17
1.1 ETIOPATOGENIA.....	19
1.2 CLÍNICA.....	22
1.3 DIAGNÓSTICO.....	23
1.4 TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO.....	24
1.5 PREVENCIÓN.....	24
CAPÍTULO 2.....	25
SÍNDROME DESCOMPRESIVO EN TORTUGAS MARINAS.....	25
2.1 FISIOLÓGÍA DEL BUCEO EN TORTUGAS MARINAS.....	27
2.2 SISTEMA RESPIRATORIO.....	30
<b>2.2.1 Anatomía:</b> .....	30
<b>2.2.2 Fisiología:</b> .....	32
2.3 RESPUESTA AL BUCEO.....	35
2.4 SISTEMA CIRCULATORIO.....	39
2.4.1 Anatomía.....	39
2.4.2 Fisiología cardiovascular:.....	44
2.5 SISTEMA NERVIOSO.....	49
2.6 SÍNDROME DESCOMPRESIVO.....	50
2.6.1 Etiopatogenia:.....	51
2.6.2 Clínica:.....	52
2.6.3 Diagnóstico:.....	53
2.6.4 Tratamiento y pronóstico:.....	64
<b>2.6.4.1 Tratamiento:</b> .....	64
<b>2.6.4.2 Pronóstico:</b> .....	66
2.6.5 Prevención:.....	66
CAPÍTULO 3.....	69
INTERACCIÓN PESQUERA.....	69
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	81
2.1 HIPÓTESIS.....	83
2.2 OBJETIVOS.....	84

3. METODOLOGÍA.....	85
3.1 MATERIALES .....	87
3.1.1 Obtención del preparado .....	87
3.1.2 Almacenamiento y viabilidad del preparado .....	89
3.1.3 Almacenamiento del tejido arterial y pulmonar mediante criopreservación. ....	89
3.1.4 Reactivos utilizados.....	90
3.2 MÉTODOS.....	92
3.2.1 Baño de órganos .....	92
<b>3.2.1.1 Montaje del preparado arterial y pulmonar .....</b>	<b>94</b>
<b>3.2.1.1.1 Preparado arterial: .....</b>	<b>94</b>
<b>3.2.1.1.2 Preparado pulmonar:.....</b>	<b>95</b>
<b>3.2.1.2 Preparación de los fármacos.....</b>	<b>96</b>
<b>3.2.1.3 Protocolo experimental .....</b>	<b>97</b>
3.2.1.3.1 Diseño de los estudios farmacomecánicos en anillos arteriales: .....	98
3.2.1.3.2 Diseño de los estudios farmacomecánicos en parénquima pulmonar:.....	99
<b>3.2.1.4 Valoración de los resultados.....</b>	<b>99</b>
<b>3.2.1.4.1 Análisis de las curvas concentración-respuesta:.....</b>	<b>99</b>
<b>3.2.1.4.2 Análisis estadístico .....</b>	<b>100</b>
3.2.2 Histología .....	101
<b>3.2.2.1 Obtención de tejido arterial y pulmonar.....</b>	<b>101</b>
<b>3.2.2.2 Tinción con hematoxilina eosina y Masson .....</b>	<b>101</b>
<b>3.2.2.2 Inmunohistoquímica .....</b>	<b>102</b>
3.2.3 Estudio de la expresión proteica: western blot .....	103
<b>3.2.3.1 Obtención de tejido arterial y pulmonar.....</b>	<b>103</b>
<b>3.2.3.2 Procedimiento .....</b>	<b>103</b>
<b>3.2.3.2 Análisis estadístico .....</b>	<b>106</b>
4. RESULTADOS.....	107
4.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN TORTUGAS MARINAS ADULTAS O SUBADULTAS ( <i>Caretta</i> <i>caretta</i> ): .....	109
4.1.1 Estudios funcionales: .....	109
<b>4.1.1.1 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria pulmonar:.....</b>	<b>109</b>
<b>4.1.1.1.1 Efecto de la serotonina: .....</b>	<b>109</b>
<b>4.1.1.1.2 Efecto de la acetilcolina: .....</b>	<b>110</b>
<b>4.1.1.1.3 Efecto de la adrenalina: .....</b>	<b>111</b>

4.1.1.2 Caracterización de las respuestas in vitro del esfínter de la arteria pulmonar: ..	112
4.1.1.2.1 Efecto de la serotonina: .....	112
4.1.1.2.2 Efecto de la acetilcolina: .....	113
4.1.1.2.3 Efecto de la adrenalina: .....	114
4.1.1.3 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria intrapulmonar: .....	116
4.1.1.3.1 efecto de la serotonina: .....	116
4.1.1.3.2 Efecto de la acetilcolina: .....	116
4.1.1.3.3 Efecto de la adrenalina: .....	117
4.1.1.4 Caracterización de las respuestas in vitro del parénquima pulmonar:.....	118
4.1.1.4.1 Efecto de la serotonina: .....	118
4.1.1.4.2 Efecto de la acetilcolina: .....	119
4.1.1.4.3 Efecto de la adrenalina: .....	119
4.1.1.4.4 Efecto de la histamina:.....	120
4.1.1.5 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria sistémica:.....	121
4.1.1.5.1 Efecto de la acetilcolina: .....	121
4.1.1.5.2 Efecto de la adrenalina: .....	122
4.1.2 Descripción histológica de la arteria pulmonar y el esfínter de la arteria pulmonar ....	123
4.1.3 Estudio de la distribución y expresión de los receptores muscarínicos y adrenérgicos en el esfínter de la arteria pulmonar y el parénquima pulmonar .....	125
4.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN TORTUGAS MARINAS NEONATAS ( <i>Caretta caretta</i> ): .....	129
4.2.1 Estudios funcionales: .....	129
4.2.1.1 Caracterización de las respuestas in vitro del esfínter de la arteria pulmonar: ..	129
4.2.1.1.1 Efecto de la serotonina: .....	129
4.2.1.1.2 Efecto de la acetilcolina: .....	130
4.2.1.1.3 Efecto de la adrenalina: .....	131
4.2.1.2 Caracterización de las respuestas in vitro del parénquima pulmonar:.....	132
4.2.1.2.1 Efecto de la acetilcolina: .....	132
4.2.1.2.2 Efecto de la adrenalina: .....	133
4.2.1.2.3 Efecto de la histamina:.....	134
4.3 RESULTADOS OBTENIDOS EN TORTUGAS DE AGUA DULCE ( <i>Trachemys scripta</i> ): .....	135
4.3.1 Estudios funcionales: .....	135
4.3.1.1 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria pulmonar:.....	135
4.3.1.1.1 Efecto de la serotonina: .....	135
4.3.1.1.2 efecto de la acetilcolina: .....	136

4.3.1.1.3 Efecto de la adrenalina: .....	137
4.3.1.2 Caracterización de las respuestas in vitro del parénquima pulmonar:.....	138
4.3.1.2.1 Efecto de la serotonina: .....	138
4.3.1.2.1 Efecto de la acetilcolina: .....	139
4.3.1.2.2 Efecto de la adrenalina: .....	139
4.3.1.2.3 Efecto de la histamina:.....	140
5. DISCUSIÓN .....	143
6. CONCLUSIONES .....	153
8. BIBLIOGRAFÍA .....	157
9. ÍNDICE ABREVIATURAS .....	169

## **1. INTRODUCCIÓN**





## **CAPÍTULO 1**

### **ANTECEDENTES: ENFERMEDAD DESCOMPRESIVA EN MEDICINA HUMANA**



El medio acuático impone importantes variaciones ambientales de presión, temperatura, aerobiosis, densidad y transmisión de luz y sonido. La actividad humana y el ejercicio en estas condiciones ambientales han de estar necesariamente influenciadas por ellas. Cualquier anomalía dentro del agua puede suponer el desarrollo de patología en el hombre y como veremos, en ciertas especies de animales marinos.

El buceo con escafandra añade nuevos cambios ambientales. El buzo se adapta con facilidad a la presión ambiental y respira aire, o bien una mezcla gaseosa sintética, a una presión inspiratoria igual a la presión hidrostática. Como resultado de ello, el cuerpo experimenta cambios en la fisiología respiratoria y en el equilibrio hemodinámico, como mecanismo de adaptación ambiental, pero sufre además variaciones en el volumen y en el comportamiento de los gases orgánicos, que dependen de las modificaciones de presión y que afectan a un gran número de funciones biológicas.

## **1.1 ETIOPATOGENIA**

La presión parcial de los gases integrantes de una mezcla respiratoria (oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno, helio) depende de su concentración en ella y aumenta de forma proporcional a la temperatura y a la presión absoluta, según establece la ley de Dalton.

El nitrógeno atmosférico, o en su defecto el helio, se comporta como gas inerte: no se metaboliza ni combina con ningún sistema biológico y permanece disuelto, aunque inactivo, en la sangre.

En virtud de la ley de Henry la solubilidad de los gases respiratorios aumenta de forma proporcional a su presión parcial; ello significa que el buceador está sometido en todo momento a un estado de hiperoxia y de hipersolubilidad nitrogénica proporcional a la profundidad alcanzada.

El nitrógeno es más liposoluble que hidrosoluble, por lo que su difusión es mayor hacia los tejidos ricos en grasa, como el cerebro; la menor tasa de perfusión de esto condiciona que frente a variaciones de presión ambiental, que comportan aumentos de solubilidad de nitrógeno, los tejidos más ricos en grasa tardan más tiempo en alcanzar el estado de saturación obedeciendo a mecanismos de difusión simple.

El cuerpo humano se comporta como un sistema multicompartimental y al aumentar la presión ambiental, la presión del gas disuelto de cada tejido se mantiene durante un cierto tiempo por debajo de la presión parcial del gas en función de las características de solución, difusión y perfusión del tejido en cuestión. Este concepto básico fundamenta la llamada “teoría de descompresión”, basada en las observaciones iniciales de Haldane en 1922 y complementadas por numerosos autores [1, 2]. Según estos principios, los diversos compartimentos orgánicos, llamados “tejidos”, se clasifican en rápidos o lentos en función del tiempo requerido para alcanzar su estado de hemisaturación, o valor intermedio hacia el estado de saturación en que cada tejido solubiliza la mayor cantidad posible de gas inerte dentro de un valor estable de presión, o lo que es lo mismo, en que la presión de gas disuelto es de nuevo igual a su presión parcial. Durante el retorno a la superficie, los gases respiratorios recuperan el valor de la presión atmosférica. La desaturación de los tejidos obedece a los mismos principios anteriores; los tejidos lentos permanecen sobresaturados durante bastante tiempo y mantienen su presión de gas disuelto por encima de la presión parcial. El buceador debe liberar el sobrante de gas inerte durante las etapas finales de la inmersión. En función de la profundidad máxima alcanzada y del tiempo total transcurrido, las tablas de descompresión le indican cuánto tiempo debe permanecer inmóvil, a una profundidad de 3, 6, 9 metros o más; de esta manera permitirá que la eliminación de gas mantenga la sobresaturación de sus tejidos dentro de unos límites aceptables, de tal forma que la depuración total del gas podrá tardar varias horas en conseguirse. Si este procedimiento descompresivo se omite, o no se realiza de forma adecuada, la sobresaturación de algunos tejidos puede ser excesiva frente a otros desaturados. Cuando la relación entre estos dos conceptos sobrepasa un valor determinado se alcanza el “punto crítico de sobresaturación”, a partir del cual el gas cambia de estado y forma burbujas.

Las microburbujas inicialmente formadas pueden confluír unas con otras y formar elementos de mayor tamaño; durante el descenso de la presión ambiental inherente a la inmersión, todos los elementos gaseosos experimentan aumentos importantes de volumen inversamente proporcionales a la presión absoluta, según establece la ley de Boyle-Mariotte.

Las microburbujas descompresivas pueden permanecer en principio dentro de los tejidos. Según su volumen y su número, pueden continuar asintomáticas, o bien, producir efectos irritativos locales, compresión de estructuras neurológicas vecinas, compresión y oclusión de microestructuras vasculares, en especial endoteliales, e incluso provocar lesiones hísticas directas o fenómenos isquémicos sobre territorios adyacentes.

Algunas burbujas son recogidas por el sistema venoso y/o linfático. A partir de este momento las burbujas son intravasculares y circulan libremente por el torrente sanguíneo venoso de retorno. La red alveolocapilar pulmonar realiza, en principio, una función de filtro: elimina por vía respiratoria la mayoría de burbujas que no llegan a ser sintomáticas (burbujas silenciosas o inestables) o que pueden producir a lo sumo una sensación transitoria de dificultad respiratoria moderada y someten al accidentado a un estado fugaz de insuficiencia respiratoria restrictiva [3-5].

Si el embolismo venoso es de gran envergadura, el filtro alveolocapilar puede quedar colapsado y el aumento de presión del círculo menor provocará dos tipos de fenómenos. Por un lado, la apertura de comunicaciones arteriovenosas. Las microburbujas pasan entonces a la circulación arterial y circulan en principio por los grandes vasos de menor calibre, donde se convierten en burbujas estables o sintomáticas. Las burbujas son la causa de problemas locales y desencadenan oclusiones vasculares difícilmente reversibles, que por la propia anatomía, concurren con preferencia en el sistema nervioso central.

Pero la patogenia de la enfermedad descompresiva no depende solo de la embolización gaseosa, ya que la simple existencia de burbujas en la sangre desencadena una serie de patologías asociadas que generan una auténtica enfermedad sistémica. La burbuja desencadena fenómenos electrostáticos de superficie en la interfase burbuja/sangre, que provocan la desnaturalización de lipoproteínas hidrofóbicas aerofílicas de la que resulta: hiperviscosidad plasmática, enlentecimiento de la circulación, aumento de la presión

postcapilar, aumento de permeabilidad precapilar, extravasación plasmática con hipovolemia y hemoconcentración, que inciden en la hiperviscosidad, con lo que se establece un círculo vicioso.

La burbuja se rodea además de una película de proteínas desnaturalizadas ofreciendo adherencia de leucocitos, eritrocitos y plaquetas (efecto sludge), obstruyen la circulación capilar y linfática, provocan extravasación plasmática y bloquean el drenaje linfático intersticial, con lo que inciden en el círculo anterior, aumentando la hiperviscosidad y la hemoconcentración. Las proteínas desnaturalizadas, por su parte, activan por la vía intrínseca de la coagulación, el factor Hageman y promueven la secreción de sustancias vasoactivas, en especial calicreína y bradicinina que, junto a la activación concomitante del complemento mediante el factor de Hageman fraccionado, dan lugar a fenómenos de quimiotaxis y a la activación del plasminógeno. Así pues, el buceado afectado de enfermedad descompresiva se encuentra sumido en un grave conjunto sintomático cuyas repercusiones sobrepasan mucho las lesiones de una oclusión vascular aguda [6].

## **1.2 CLÍNICA**

Aparecen síntomas neurológicos de características variadas en función de la cantidad de tejido infiltrado, del número y del tamaño de burbujas formadas y sobre todo, de la localización del territorio neurológico afectado. La sintomatología, en consecuencia, podrá ser muy variable; desde ligeras parestesias y/o disestesias en cualquier territorio del organismo hasta monoparesias estrictas. Si la embolización es fugaz, el problema se restablece al cabo de unos segundos. Si por el contrario, la intensidad de la embolización se mantiene, la situación de colapso alveolocapilar se traduce en una sensación de opresión precordial, con disnea e incluso insuficiencia respiratoria restrictiva transitoria. La mayor parte de las veces este estado es transitorio y remite en pocos minutos [7].

En accidentes descompresivos muy importantes algunas burbujas pueden acceder a la circulación arterial y provocar efectos embolígenos en territorios distales. Los órganos afectados radican también en el sistema nervioso central, aunque la embolización será entonces con preferencia cerebral.

Otras burbujas se forman dentro del sistema linfático y estructuras afines empeorando el drenaje intersticial. También en la endolinfa se pueden formar burbujas que comprometen la función vestibular [8].

Además, las revisiones periódicas en los buceadores profesionales han puesto de manifiesto que algunos de ellos sufren una forma de necrosis aséptica ósea que afecta con exclusividad a la cabeza o metáfisis de huesos largos además del ilíaco. Esta patología se conoce como osteonecrosis disbárica.

La sintomatología de los accidentes descompresivos más graves suele aparecer en las últimas etapas del ascenso. Los síntomas no embólicos suelen tardar algunos minutos, o varias horas en aparecer. No es excepcional que un accidente descompresivo menor se inicie al cabo de 6 horas, o más, después de finalizar la inmersión. En agresiones menores los síntomas pueden tardar horas en aparecer.

La edad, la obesidad, el ejercicio, el frío, son factores de riesgo y pueden predisponer al buceador a sufrir un accidente tras inmersiones aparentemente seguras [9].

### **1.3 DIAGNÓSTICO**

El cuadro clínico y el antecedente de una inmersión con escafandra en las horas anteriores sugieren, en la mayoría de los casos, un accidente disbárico. Las lesiones cutáneas irritativas o alérgicas, el dolor muscular traumático, el vértigo periférico, la cinetosis, la opresión precordial angoroide, la parálisis, el estado de pre-ahogamiento y algunos trastornos neurológicos han de incluirse en el diagnóstico diferencial [10, 11].

Los resultados de las analíticas sanguíneas aportan una información muy importante para el diagnóstico. Es frecuente detectar elevaciones del hematocrito y de las proteínas séricas, indicadoras de trastorno hemodinámico profundo con hemoconcentración; disminución del recuento de plaquetas, sin alcanzar trombocitopenias importantes, junto al hallazgo de productos de degradación del fibrinógenos y elevaciones moderadas de transaminasa glutamicooxalacética, creatinquinasa y lactatodeshidrogenasa.

Sin duda el uso de la radiología es de gran importancia, no tanto la radiografía pero si la ecografía. Por medio de la ecografía, ayudados en muchos casos del Doppler, podemos visualizar la presencia de burbujas en el torrente circulatorio. La cuantificación de los resultados permite establecer cinco estadios clínicos al igual que en tortugas marinas.

#### **1.4 TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO**

Depende de la gravedad de la agresión, de la repercusión hemodinámica, de factores individuales y de la premura, del tipo y de la eficacia del tratamiento hiperbárico aplicado, complementado con la asistencia intensiva cuando sea necesario.

Los casos no tratados evolucionan hacia la perpetuación de secuelas neurológicas residuales, muchas veces invalidantes.

Los tratamientos farmacológicos dosificados convencionales nunca sustituyen, tan solo demoran, la recompresión en cámara hiperbárica, que es la única forma terapéutica etiológica y plenamente eficaz.

#### **1.5 PREVENCIÓN**

La única forma de prevenir el accidente de descompresión consiste en realizar una inmersión lenta y pausada con una velocidad de ascenso no superior a 12-18 metros por minuto y realizando a determinadas cotas de profundidad paradas de descompresión que permitan liberar el exceso de gas inerte de los tejidos saturados.



## **CAPÍTULO 2**

# **SÍNDROME DESCOMPRESIVO EN TORTUGAS MARINAS**



El síndrome descompresivo es un trastorno clínico que resulta de la formación de burbujas de nitrógeno dentro del sistema cardiovascular y otros tejidos como consecuencia de una rápida descompresión y debido, como veremos en la presente tesis, a un fallo en los mecanismos fisiológicos protectores. Los signos clínicos y las lesiones en los tejidos asociados al síndrome descompresivo son causados por el embolismo gaseoso, que lesiona los tejidos por oclusión vascular, compresión mecánica e incluso cambios bioquímicos. La distinción entre síndrome descompresivo, la entidad clínica, y el fenómeno de embolia gaseosa es importante ya que la embolia gaseosa no siempre causa signos clínicos. Hasta la fecha el síndrome descompresivo solo ha sido estudiado en ejemplares de *Caretta caretta* que han llegado al centro de recuperación Arca del Mar de Valencia tras haber sido capturados en redes de arrastre y trasmallo a incluso tan solo 10 metros de profundidad [12]. Para entender cómo se desencadena esta patología en estas especies es importante conocer tanto sus patrones y capacidades de buceo como las adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permiten desarrollar esta actividad.

## **2.1 FISIOLÓGÍA DEL BUCEO EN TORTUGAS MARINAS**

Las tortugas marinas son uno de los vertebrados buceadores que realizan inmersiones más prolongadas y profundas. En el medio natural la mayoría de especies solo permanece de un 3% a un 6% de su tiempo en la superficie, donde los riesgos de depredación y los costes metabólicos para sobrevivir son mayores, de ahí que estas especies sean consideradas realmente subacuáticas. Las características principales de su capacidad de buceo implican un sistema de transporte de oxígeno altamente eficiente y una extraordinaria tolerancia a la hipoxia que permite el uso máximo de las reservas limitadas de oxígeno. Existen diferentes aspectos fisiológicos que permiten este tipo de adaptación durante el buceo como son los patrones intermitentes de respiración, su metabolismo adaptativo o su gran tolerancia hipóxica. Éstas son características comunes al resto de reptiles e indudablemente estaban presentes en los reptiles terrestres ancestrales de los que proceden las tortugas marinas. Aun así las tortugas marinas poseen modificaciones distintivas tanto morfológicas como fisiológicas que les permiten explotar al máximo el entorno marino de forma única, además

de interesantes paralelismos a nivel adaptativo cuando se comparan con los mamíferos marinos [13, 14].

Entre ellas podemos destacar que para una locomoción eficiente bajo el agua el cuerpo de las tortugas marinas presenta diversas modificaciones como se aprecia en la morfología de sus aletas, en la reducción en el peso del caparazón o su cuello más corto. Además, sus cornetes nasales presentan una anatomía que permite que se cierren durante el buceo evitando la aspiración de agua; en las órbitas oculares se localizan las glándulas de la sal que permiten la excreción del exceso de sal e incluso algunas especies (*Dermochelys coriacea*) presentan adaptaciones que les permiten ser capaces de conservar la temperatura de tal forma que les permita nadar en aguas frías [15].

Aun así, las adaptaciones respiratorias más importantes que facilitan este tipo de buceo son aquellas que facilitan un intercambio gaseoso rápido y eficiente cuando los animales se encuentran en la superficie marina, y que además, maximizan las reservas de oxígeno y su distribución a los tejidos cuando los animales están sumergidos.

#### **Patrones naturales de buceo:**

Las inmersiones más largas reportadas en tortugas marinas varían de 2 a 5 horas de duración, la mejora en los sistemas de seguimiento acoplados a estos animales está ayudando cada vez más a obtener datos más precisos. En la mayoría de casos parece que existe una relación entre el máximo de profundidad alcanzada y la duración del buceo. A pesar de la brevedad de sus fases respiratorias, las tortugas marinas (depende de la especie) solo permanecen en la superficie del 3 al 26 % de su tiempo. Durante el mismo toman el sol, se alimentan, se orientan y se aparean.

Estos animales muestran un amplio rango de profundidades y tiempos de buceo según la especie. Los buceadores más profundos registrados han sido hembras de la especie *Dermochelys coriacea* ( $\geq 1000\text{m}$ ) [16], seguidas de la especie *Lepidochelys olivácea* (290m, sexo desconocido) [17] y hembras adultas de la especie *Caretta caretta* (233m) [18] *Eretmochelys imbricata* es la especie con los tiempos de buceo publicados más prolongados (56.1 minutos, sexo desconocido) [19].

La evidente amplia variación entre especies nos recuerda que las características de sus perfiles de buceo no son solo un reflejo de su tamaño y características fisiológicas, sino también de su ecología, medio ambiente e historia natural. En la tabla 1 se representan los datos publicados en las diferentes especies.

Especie	Profundidad (metros)		Duración (minutos)		% Tiempo sumergido
	Máximo	Rutina	Máximo	Rutina	
<i>Carreta caretta</i>	211- 233	9-22		17-30	80-94
<i>Lepidochelys kempí</i>		≤50	300	12.7- 18.1	96
<i>Lepidochelysolivacea</i>	290			54.3	
<i>Chelonia mydas</i>	110	≤20	66	9-23	
<i>Eretmochelys imbricata</i>			73.5	56.1	
<i>Dermodochelys coriacea</i>	1000	50-84	37.4	10-14.5	74-91

Tabla 1: Profundidad, duración de la inmersión y porcentaje del tiempo sumergido en las diferentes especies de tortugas marinas.

Es evidente que el tiempo que estas especies permanecen en la superficie es muy limitado y durante el mismo han de eliminar todo el CO<sub>2</sub> acumulado durante el buceo y tomar el oxígeno necesario para la siguiente inmersión. Por ello sus pulmones presentan características únicas, innecesarias en tortugas terrestres, que permitan un intercambio gaseoso rápido y eficaz. Las tortugas marinas solo necesitan algunas respiraciones de dos a tres segundos de duración para completar su intercambio gaseoso. Aun así, existe una tendencia a aumentar el número de respiraciones en cada episodio respiratorio a medida que aumenta el tiempo de buceo, independientemente de la actividad [20, 21]. Por ejemplo, en el caso de *Chelonia mydas* y *Carreta caretta*, se ha observado que la respiración en condiciones de hipoxia e hipercapnia causa una alteración en los patrones respiratorios normales. Los cambios observados varían desde respiraciones aisladas intermitentes a clusters de respiraciones múltiples, breves periodos de apnea y en ocasiones respiraciones seriadas continuas [20-23].

Para entender mejor el síndrome descompresivo en estos animales es importante destacar antes ciertos aspectos de su anatomía y fisiología.

## **2.2 SISTEMA RESPIRATORIO**

El sistema respiratorio participa en el intercambio gaseoso, en el control de la flotabilidad, el control de la temperatura corporal y en el sentido del olfato. Sus adaptaciones relacionadas con el buceo son de las más estudiadas en estas especies. La interconexión anatómica, comportamental y fisiológica es de gran relevancia a la hora de realizar una evaluación clínica, en procedimientos anestésicos o cuando nos enfrentamos a patologías relacionadas con el sistema respiratorio como es el caso de la embolia gaseosa.

### **2.2.1 Anatomía:**

La inspiración/expiración se realiza a través de las fosas nasales, no siendo fisiológica la respiración a través de la boca. El aire inspirado penetra en la tráquea a través de la glotis, la cual se encuentra a nivel caudal de la base de la lengua. Esta se continúa por el celoma hasta dividirse en dos bronquios principales, derecho e izquierdo.

La particular disposición de los pulmones bajo el caparazón hace que los dos bronquios presenten una trayectoria ventro-dorso-craneal para así poder entrar en los pulmones.

A nivel anatómico las tortugas marinas poseen unos pulmones que se estrechan distalmente y que discurren ventrales al caparazón dentro de la cavidad pleuroperitoneal. Éstos están fuertemente adheridos a la pared dorsal a lo largo del eje vertebral [23]. Ventralmente el pulmón derecho se une al lóbulo derecho del hígado por el ligamento hepatopulmonar, que se continúa caudalmente con parte del mesocolon. La porción craneal del pulmón derecho se une al estómago a través de un amplio ligamento gastropulmonar. En *Chelonia* existe un ligamento secundario, llamado pneumocólico que une la porción media-ventral del pulmón izquierdo con la flexura descendente transversa del colón.

En tortugas marinas los pulmones son multicamerales aunque esto no sea visible externamente [24] su estructura es esponjosa, presentan bandas de músculo liso y tejido conectivo y su superficie tiene un aspecto reticulado similar al descrito en otras especies de

reptiles [24], aunque su rápido funcionamiento supone estructuras únicas no descritas en otros pulmones reptilianos. Entre estas estructuras destacan unas vías respiratorias fuertemente reforzadas y más largas y un bronquio intrapulmonar subdividido en vías secundarias también muy reforzadas que se ramifican desde el bronquio principal y disminuyen gradualmente su diámetro hasta alcanzar las zonas más periféricas y marginales del pulmón. La estructura multicameral de sus pulmones es relativamente compleja para tratarse de reptiles y tiene una doble red capilar que contribuye a una eficaz difusión sanguínea. Los diferentes tipos de pulmón en reptiles están representados en la figura 1.

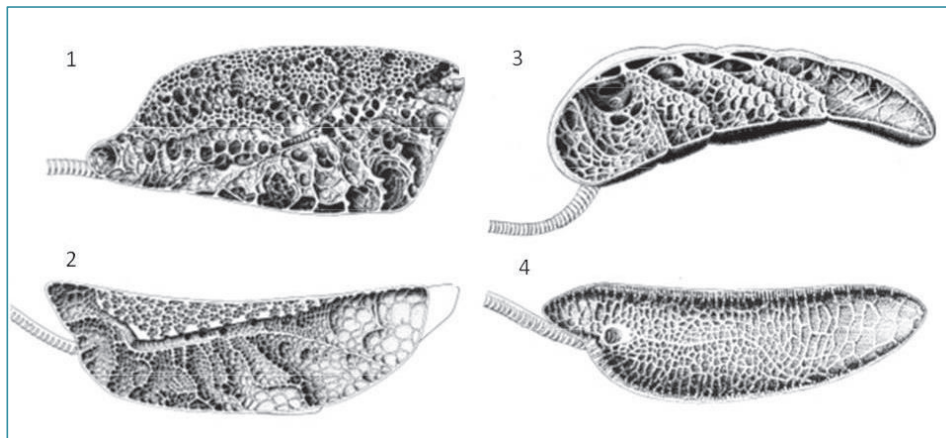


Figura 1: Ilustración de los diferentes tipos de pulmones en reptiles. (1) multicameral (2 y 3) paucicameral (4) unicameral simple. 1: Crocodile, *Caiman crocodilus*; 2: Varanid lizard, *Varanus exanthematicus*; 3: Turtle, *Pseudemys scripta*; 4: Teju lizard, *Tupinambis nigropunctatus*. (Duncker, 1978).

Los estudios más recientes en pulmón de las especies *Caretta caretta* y *Chelonia mydas* señalan que el cartílago se encuentra presente en todo el tejido excepto en la región central de los bronquiolos respiratorios. Además, todas las vías respiratorias contienen músculo liso fuertemente asociado a una matriz de fibras elásticas [20, 24, 25]. El parénquima es homogéneo y cerca del alveolo localizamos tejido conectivo y prominentes paquetes de fibras mioelásticas como principal diferencia respecto a otras especies [20, 24, 25].

En los mamíferos marinos se han descrito estructuras anatómicas similares que facilitan flujos ventilatorios elevados ya que ofrecen un soporte mecánico contra el colapso de las

vías respiratorias debido a la presión hidrostática, siendo muy probable que en las tortugas marinas estas estructuras cumplan la misma función [26-28].

A pesar de que su anatomía pulmonar ya está presente desde embriones [24] inicialmente las tortugas marinas no son capaces de bucear a gran profundidad y está descrito que necesitan varios meses de vida para desarrollar su flotabilidad [29]. La profundidad de sus inmersiones y la duración de las mismas aumentan con el crecimiento de los pulmones (biomasa), la maduración del sistema de transporte de oxígeno y el desarrollo estructural de los pulmones. Las tortugas marinas presentan sistemas únicos para la asimilación y eliminación de los gases respiratorios.

El pulmón es el principal reservorio de oxígeno, y según lo descrito por Lutcavage y colaboradores en 1989 [20] en la especie *Caretta caretta* es almacenado dentro de la sangre y los tejidos.

Además, los pulmones también participan en el control de la flotabilidad y, comparada con otros animales buceadores, esta característica resulta especialmente bien desarrollada en estas especies ya que varían la cantidad de aire inspirado para alterar su flotabilidad [29, 30].

### **2.2.2 Fisiología:**

Como en otros reptiles, la ventilación se caracteriza por breves respiraciones o respiraciones únicas separadas por periodos de apnea. Este patrón está ya presente incluso en los nidos en el momento de la eclosión. Estas especies poseen los valores más altos de consumo de oxígeno y aprovechamiento aeróbico entre todos los reptiles. Por ejemplo, las tortugas verdes y Laúd pueden aumentar la absorción de oxígeno en reposo de 8 a 15 veces y alcanzar los valores máximos comparables con los valores alcanzados por la mayoría de mamíferos [22]. Esto se ve facilitado por su anatomía pulmonar y su superficie respiratoria ampliamente subdividida, que permite una mayor área de intercambio y una menor resistencia a la difusión gaseosa, comparada con la estudiada en otras especies de reptiles. Por ejemplo, la capacidad de difusión de *Caretta caretta* ( $0,11 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ Torr}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ )



es el doble de la del resto de reptiles (excluyendo a los varánidos) y un 25% mayor que la de los mamíferos [31]. Esto supone una ventaja durante inmersiones prolongadas cuando estos animales consumen las reservas de oxígeno pulmonares, arteriales y venosas. La leve resistencia pulmonar también facilitará las altas tasas metabólicas observadas durante el ejercicio máximo de las tortugas marinas al mantener altos niveles de saturación en sangre arterial [31].

De forma general, el cerebro de la mayoría de vertebrados tiene una dependencia absoluta del oxígeno y sufre necrosis al pasar unos minutos de anoxia. A pesar de esto, [14] describió que los cerebros de varias especies de tortugas de agua dulce y el de *Caretta caretta* tiene la extraordinaria capacidad de sobrevivir en anoxia durante varias horas, indicando que estas especies pueden permanecer bajo el agua durante prolongados periodos de tiempo sin respirar. Los mecanismos que protegen su cerebro de la anoxia han sido estudiados en múltiples estudios [32, 33]. En resumen, el cerebro anóxico de las tortugas es capaz de mantener niveles de ATP y homeostasia iónica adecuados reduciendo sus demandas metabólicas a tal nivel que puedan ser completamente cubiertas por glicolisis anaerobia. Entre los factores implicados se describen: un aumento en la concentración y liberación de neurotransmisores inhibitorios como el ácido gamma aminobutírico o co-factores como la adenosina, y una reducción en la concentración de neurotransmisores excitatorios como el glutamato [33].

Los valores de los flujos espiratorios publicados en tortugas marinas son mucho mayores que aquellos publicados en otros reptiles y se aproximan a los valores publicados en mamíferos marinos [34]. El volumen tidal en tortugas marinas es muy variable y está influenciado por las condiciones físicas empleadas para obtener estos datos, por ejemplo, realizar la toma de datos cuando el animal está nadando, respecto a inmobilizado fuera del agua o dispuesto en posición supina. A pesar de ello, en *Caretta caretta* [20] los valores aceptados oscilan de 33 a 49 ml kg<sup>-1</sup>, en *Dermochelys coriacea* es de 4,14 ml kg<sup>-1</sup> [20] y en *Chelonia mydas* de 24 a 187 ml kg<sup>-1</sup> [13] lo que representa del 27% hasta el 80% del volumen pulmonar total para estas especies. Estos volúmenes son mucho mayores que aquellos descritos en otros reptiles (*Trachemys scripta*, 6,9 ml kg<sup>-1</sup>) y permite a las tortugas marinas completar el intercambio de gases pulmonares en pocas respiraciones.

Las tortugas marinas no presentan músculo diafragmático, por ello realizan el intercambio gaseoso a través de cambios de presión intracelómicos, facilitado por los músculos pélvicos, cervicales y pectorales. A pesar del refuerzo con tejido conectivo y mioelástico, la complianza del sistema respiratorio de las tortugas marinas ( $C_T = 11 \text{ ml cm H}_2\text{O}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ , *Caretta caretta* ) [20] refleja las características de presión y volumen de su pared corporal siendo sólo ligeramente menores que las de reptiles con pulmones más sencillos y con menos modificaciones estructurales (por ejemplo Gecko  $16 \text{ ml cm H}_2\text{O}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ). En buceadores de gran profundidad la complianza de la pared costal previene la compresión torácica durante el colapso pulmonar, situación que puede impedir el flujo de la circulación central [28].

El colapso pulmonar completo se cree que sucede en tortugas marinas cuando bucean a presiones equivalentes a las adquiridas a profundidades entre 80 y 160 metros. El confinamiento del gas en las áreas marginales de los pulmones durante inmersiones profundas puede ayudar a prevenir la hipersaturación de los tejidos por el nitrógeno, comúnmente conocido como “the bends”. Aun así existen ya varias evidencias de que las tortugas marinas no están completamente protegidas frente a esta alteración. Se han observado burbujas de gas en los capilares de tortugas verdes muertas tras un ascenso rápido de presión en cámaras hiperbáricas donde los animales fueron sometidos a presiones iniciales de 14,5 atmósferas y a continuación a una descompresión veloz [35]. Además, diversos estudios correlacionan la necrosis avascular en huesos largos hallada en especies extintas de tortugas marinas y mosasaurios con los daños derivados de la enfermedad descompresiva. Estos hallazgos son de animales pertenecientes al Cretáceo pero no han sido descritos en especies del Mioceno lo que sugiere que estas especies desarrollaron tanto adaptaciones fisiológicas como comportamentales para mitigar las patologías derivadas de condiciones hiperbáricas como es el síndrome descompresivo [36]. No fue hasta 2014, cuando García- Párraga y colaboradores [12] describieron por primera vez esta patología en una de las especies actuales, *Caretta caretta*.

Mientras que la compresión pasiva y el colapso son realmente importantes para alterar el intercambio pulmonar de gases, los vertebrados marinos pueden haber desarrollado mecanismos adicionales que pueden ayudar a limitar la absorción de  $\text{N}_2$ .

En *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* y *Dermochelys coriacea* se ha descrito un importante esfínter muscular en la arteria pulmonar en su región proximal al pulmón [37, 38]. Se ha especulado que el mecanismo de esta región anatómica ayuda a derivar la sangre más allá del pulmón durante el buceo [12, 37]. Para investigar esta hipótesis y conocer su verdadera funcionalidad ha sido propuesta la presente tesis.

### **2.3 RESPUESTA AL BUCEO**

Para entender perfectamente cómo estas especies son capaces de bucear en las características descritas anteriormente es importante comprender una serie de adaptaciones englobadas en la conocida “respuesta al buceo”. Inicialmente fue estudiada durante inmersiones forzadas en mamíferos marinos y reptiles y consiste esencialmente en una respuesta fisiológica de emergencia condicionada a circunstancias especiales y que no está presente durante inmersiones “rutinarias”.

La respuesta al buceo es uno de los rasgos fisiológicos más estudiados relacionados con el buceo y que se ha observado en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha. La respuesta al buceo o de inmersión incluye una serie de adaptaciones como es una reducción de la frecuencia cardíaca (bradicardia) o vasoconstricción periférica, lo que resulta en una reducción del gasto cardíaco. Se ha sugerido que el objetivo principal de la respuesta de inmersión es conservar el oxígeno disponible para los órganos vitales con limitada tolerancia a la hipoxia, como son el cerebro y el corazón [39]. El coste, aun así, implica que el animal incurra en una deuda de oxígeno que deberá ser devuelta cuando el vuelva a respirar.

En *Chelonia mydas* se ha observado un descenso de la frecuencia cardíaca de 20-30 latidos por minuto a menos de 1 latido por minuto [35].

Si la respuesta al buceo funciona adecuadamente puede ayudar a extender el límite de la inmersión aeróbica [40]. También se ha sugerido que la respuesta al buceo puede ayudar a reducir la captación de nitrógeno durante los tramos profundos de la inmersión [41, 42] ya que la compresión y colapso alveolar limita el intercambio gaseoso y reduce aún más la

cantidad de nitrógeno absorbido [26, 42-46]. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los mamíferos marinos pueden experimentar embolia gaseosa en circunstancias inusuales llegando a causar un traumatismo disbárico [11, 47-50].

En el estudio publicado por García-Párraga y colaboradores en 2014 [12] se incluían pruebas de imagen que mostraban embolia gaseosa generalizada en los vasos de riñones, hígado y médula espinal, así como en tejidos adyacentes.

Por lo tanto, estos síntomas, en asociación con un evento descompresivo, son consistentes con los descritos en casos de enfermedad descompresiva en medicina humana. El uso reciente de la tomografía axial computerizada (TAC) ha ayudado a mejorar la comprensión de la arquitectura funcional del pulmón en vivo. Además del TAC, la resonancia magnética (RMN) también promete ayudarnos a entender mucho mejor la fisiología de estas especies, aunque los estudios son aún muy incipientes.

Además de estas adaptaciones, es importante señalar que en tortugas de la especie *Caretta caretta*, especialmente, nos encontramos los valores de hematocritos más elevados (incluso en condiciones normales) y las mayores concentraciones de hemoglobina y mioglobina, por lo que sus capacidades para transportar el oxígeno nada tienen que envidiar a las de los mamíferos [51]. La hemoglobina de los reptiles posee una menor afinidad por el oxígeno comparada con la de los mamíferos, lo que significa que el oxígeno está disponible para los tejidos con mayor rapidez. Esta característica permite suministrar oxígeno a los tejidos incluso cuando las reservas de oxígeno son muy escasas y por lo tanto obtener un rendimiento mayor de difusión del oxígeno con un hematocrito menor (aportando también la ventaja de una menor viscosidad sanguínea) y menores costes energéticos. En circunstancias normales las tortugas marinas permanecen en apnea hasta que sus reservas de oxígeno alcanzan bajas presiones parciales. Los sistemas tampón tanto del sistema circulatorio como esquelético de estos animales pueden sobrellevar la acumulación de ácido láctico e iones de hidrógeno que se acumulan durante este periodo de apnea [23]. Mientras que la ventilación en los mamíferos se controla según un estrecho rango de variaciones en el pCO<sub>2</sub> sanguíneo y pH, el pH en los reptiles puede fluctuar de forma más amplia.

Además, el efecto Bohr, que describe el efecto del pH y el dióxido de carbono sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, tiene una influencia menor en tortugas marinas que en otras especies de reptiles [52].

La comunidad científica aceptaba que las inmersiones voluntarias eran aeróbicas, mostrando un ligero aumento en la concentración de lactato sanguíneo y cambios muy leves en el estado ácido- básico. Pero estudios realizados en animales a los que se les sometió a inmersiones forzadas no indican lo mismo. En estos casos las reservas de oxígeno se consumen muy rápido, se activan procesos de glicólisis anaeróbica y se altera el balance ácido- básico hasta niveles, en ocasiones, mortales. En juveniles de *Lepidochelys kempii* se observó que tras 7,3 minutos de inmersión a 23°C en redes de arrastre los animales sufrían una marcada acidosis metabólica (aumentando el lactato seis veces por encima de los valores basales obtenidos) y un incremento en la frecuencia respiratoria diez veces más elevada. En los ejemplares de *Caretta caretta* capturados con redes de arrastre en los que el arte de pesca duró menos de 30 minutos se observaron severas acidosis metabólicas con valores sanguíneos de lactato que varían de 8,8 a 16,2 mM. Tras inmersiones forzadas, estos animales hiperventilan durante más de 30 minutos y permanecen en acidosis metabólica durante horas (con las importantes y letales consecuencias que supone). Los tiempos necesarios para recuperarse sin tratamiento de estas acidosis metabólicas requieren hasta de 20 horas en *Caretta caretta* y en *Lepidochelys kempii*, lo que implica que los animales que sufran varias recapturas tienen unas posibilidades muy elevadas de no sobrevivir ya que no tendrán tiempo de metabolizar niveles de lactato tan elevados [22].

Las tortugas marinas también regulan los niveles de oxígeno periférico dentro del cuerpo a través de derivaciones cardiovasculares. La derivación que existe desde la circulación pulmonar a la sistémica (conocido como derivación derecha – izquierda) se puede visualizar con los medios de contraste actuales. Diferentes tipos de derivaciones contribuyen a ello, por lo que algunos autores sugieren que el control de la perfusión se realiza a diferentes niveles [53]. Las derivaciones centrales o intracardiacas suceden dentro de las cámaras cardíacas y desvían la sangre de la circulación pulmonar a la circulación sistémica durante el buceo.

Las derivaciones periféricas entre las arterias y las venas también están presentes dentro de los pulmones. Más adelante profundizaremos sobre estas características circulatorias.

Factores adicionales como el tamaño, nivel de actividad, temperatura del agua y diferencias interespecíficas afectan de manera directa sobre el gasto metabólico y sobre los límites del buceo aeróbico. Esto también se verá afectado por el tiempo que permanezcan atrapadas en las redes. Por ejemplo, los animales más grandes son capaces de realizar inmersiones más prolongadas en comparación con animales más pequeños. Por ello los animales juveniles serán más vulnerables al estrés derivado de las inmersiones forzadas, especialmente los meses más cálidos cuando el gasto metabólico es mayor.

El hecho de padecer enfermedades y el estado hormonal también puede afectar a la supervivencia y disminuir el tiempo necesario para agotar las reservas de oxígeno. Hematocritos por debajo del 25% de los valores normales han sido registrados en animales capturados y supone una reducción en la capacidad de transporte de oxígeno sanguíneo. En tortugas de agua dulce, las hormonas tiroideas parecen tener un papel importante (como sucede en otras especies) en la regulación del metabolismo lo que sugiere que ciertas hormonas también pueden influir sobre el estado metabólico de las tortugas marinas.

Como conclusiones a todo lo descrito hasta ahora podemos señalar que existen paralelismos muy interesantes entre mamíferos marinos y tortugas marinas, tanto a nivel de las estructuras respiratorias como en las estrategias de buceo, dándonos un ejemplo fascinante de convergencia evolutiva.

Y aunque todavía queda mucho por aprender sobre la integración de las respuestas fisiológicas y cognitivas durante el buceo, necesitamos conocer las respuestas en el medio natural sin alterar las condiciones en el laboratorio. Actualmente se trabaja en desarrollar nuevos sensores para poder monitorizar frecuencia cardíaca, velocidad de natación o incluso medir los flujos sanguíneos. Estos sistemas ya han sido empleados en pinnípedos y aves. La telemetría por satélite también ha permitido conocer mucho más sobre los perfiles de buceo de las tortugas marinas y su comportamiento, pero necesita aún ser mucho más documentado.

## **2.4 SISTEMA CIRCULATORIO**

El sistema circulatorio y el sistema respiratorio están estructural y funcionalmente relacionados en todos los vertebrados y en muchas ocasiones se hace referencia al sistema cardiorespiratorio. Comenzaremos describiendo la anatomía cardíaca y sus diferencias respecto a otras especies, así como su funcionalidad y la importancia de las derivaciones. Posteriormente hablaremos de los grandes vasos descritos en tortugas marinas centrándonos en la anatomía y funcionalidad hasta ahora descrita de la arteria pulmonar de estas especies y de su esfínter.

### **2.4.1 Anatomía**

El corazón se localiza medial y ventral en la zona sagital dentro del celoma. Externamente se puede localizar reconociendo estructuras anatómicas clave. El plastrón de estas especies está dividido en distintos escudos, entre ellos debemos reconocer los escudos tanto humeral como pectoral. El corazón se localiza en la profundidad medial de los bordes marginales de los escudos humeral y pectoral.

La función del sistema cardiovascular en tortugas marinas es más complejo de lo que se puede pensar al estudiar su anatomía, más básica y formada principalmente por dos aurículas y un único ventrículo muscular que da lugar ventralmente a una cuarta cámara con una fina pared que conforma el seno venoso. A pesar de la forma triangular del corazón de estas especies, el ventrículo de estos animales puede alterar su forma triangular en función del estado de contracción (figura 2).

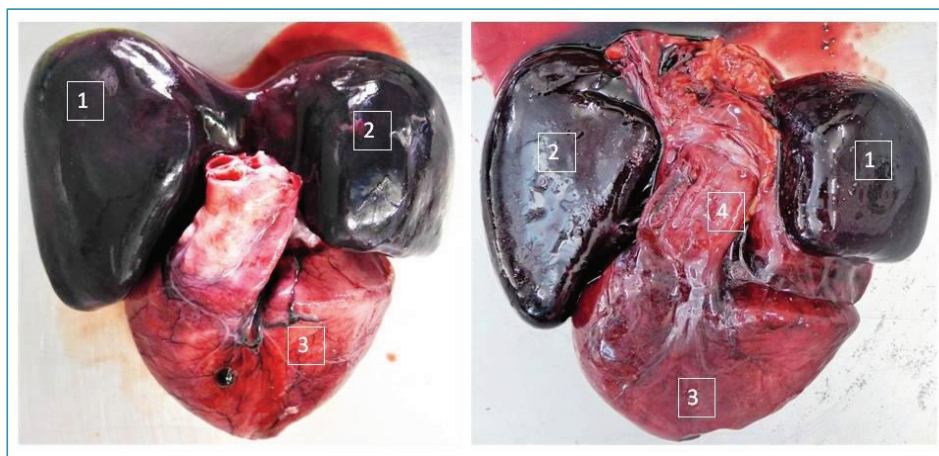


Figura 2: Imagen dorsal (izquierda) y ventral (derecha) del corazón de una tortuga marina de la especie *Caretta caretta* en el que podemos identificar: aurícula derecha (1), aurícula izquierda (2), ventrículo (3) y seno venoso (4).

A continuación detallaremos los diferentes elementos del corazón:

- **Anatomía pericárdica:** Los atrios y el ventrículo se localizan dentro del saco pericárdico. Éste es transparente en recién nacido y juvenil y se vuelve más opaco a medida que el animal se desarrolla. Es fuerte, fibroso y flexible pero no elástico. El seno venoso forma parte de la pared dorsal del pericardio. El corazón está bañado por un líquido pericárdico claro que es alcalino y rico en iones de calcio y magnesio y puede tener un papel menor como protector del músculo pericárdico frente a la acidosis durante los periodos de apnea. El ápex del ventrículo está unido ventralmente al pericardio y el peritoneo visceral a través del ligamento conocido como “gubernaculum cordis”. Este fuerte ligamento fija el ápex de ventrículo favoreciendo una tensión longitudinal durante la contracción, lo que previene al ventrículo de la retracción craneal durante la sístole.



- **Cámaras y compartimentos:** Para el estudio de todas las estructuras se han utilizado contrastes intravenosos en *Caretta caretta* [54]. El seno venoso es la primera cámara en recibir la sangre sistémica. Este largo saco con paredes estrechas se localiza dorsal a los atrios y el ventrículo y es frecuentemente ignorado y considerado como un largo vaso más que como una porción del corazón cuando se describe la anatomía cardíaca de los reptiles. Sus paredes contienen músculo cardíaco.

La sangre venosa del cuerpo drena en el seno venoso desde los vasos principales: la precava derecha e izquierda (vena cava superior derecha e izquierda), la vena hepática izquierda y la postcava (vena cava inferior y vena hepática derecha). La sangre del seno venoso drena en la aurícula muscular derecha a través de la apertura senoatrial. La aurícula derecha está completamente separada de la izquierda y es más grande y muscular.

La aurícula izquierda recibe la sangre de la arteria pulmonar a través del foramen pulmonar. De ahí la sangre es dirigida al ventrículo a través del canal atrioventricular. El ventrículo está formado por tres compartimentos o cavidades interconectadas: el cavum pulmonale, el cavum venosum y el cavum arterioso. El cavum arterioso y el cavum venoso se localizan dorsalmente respecto al cavum pulmonale. Existe un septo muscular dentro del ventrículo a lo largo de su pared interna dorsal que se extiende desde el septo interatrial hasta el ápex. No está unido a la pared ventral del ventrículo por lo que no separa el ventrículo, lo que separa parcialmente es el cavum arterioso del cavum venoso y durante la sístole puede, funcionalmente, separar la sangre sistémica de la pulmonar.

Las relaciones funcionales de las cámaras (seno venoso, aurículas y ventrículo) y los compartimentos dentro del ventrículo son más fáciles de entender al explicar el flujo sanguíneo. Primeros nos centraremos en explicar el funcionamiento de la circulación normal, entrando después con más detalle en las derivaciones que pueden producirse.

De forma general la aurícula derecha lleva la sangre al cavum venosum mientras que la sangre de la aurícula izquierda se dirige al cavum arterioso. El cavum pulmonale recibe sangre del cavum venosum. Durante la sístole ventricular la sangre puede salir del ventrículo a la circulación a través del cavum pulmonale y del cavum venoso. La sangre que sale del

cavum pulmonale va primero a la arteria pulmonar (y posteriormente en las arteriolas y capilares pulmonares). La sangre del cavum arterioso no puede salir del ventrículo directamente y tiene que pasar a través del canal intraventricular hacia el cavum venosum. Del cavum venosum la sangre fluye a través de la aorta (derecha e izquierda). El cavum venosum y el cavum pulmonale son continuos entre sí durante la diástole ventricular, por lo tanto cualquier separación entre oxígeno rico y oxígeno pobre ha de ser mantenida por medio del flujo sanguíneo o por la tunelización creada por los músculos papilares, más que por una separación física entre el circuito pulmonar y sistémico. El flujo de la sangre desde el cavum venosum y pulmonale es separado durante la contracción ventricular debido a la tensión en el ápex del ventrículo generada por el gubernaculum cordis que hemos explicado anteriormente.

- **Válvulas:** El corazón de los reptiles posee diferentes válvulas en la apertura de las aurículas, en el ventrículo y dentro de la base de los grandes vasos. Estas válvulas trabajan junto al septo muscular ventricular para separar los diferentes compartimentos y controlar la dirección del flujo sanguíneo. El foramen sinoatrial presenta prolongaciones de endocardio en forma de pseudoválvulas que separan el sinus venosus de la aurícula derecha. Estas pseudoválvulas no se encuentran en la necropsia de todos los ejemplares de tortuga marina y se cree que es debido a una rápida descomposición.

La entrada de la vena pulmonar en la aurícula izquierda no presenta una válvula como tal, pero sí estructuras como las descritas anteriormente que evitan el reflujo (posteriormente nos referiremos a esta área como válvula pulmoatrial). En chelonia, las válvulas atrioventriculares han sido descritas con formaacampanada o incluso con varias cúspides que varían en tamaño y posición [55]. Las válvulas dirigen la sangre dentro del cavum venoso y el cavum arterioso durante la sístole atrial y previenen regurgitaciones de la sangre dentro de las aurículas durante la sístole ventricular. En la base de ambas aortas están las válvulas bicúspides, con las que cuenta también el el tronco pulmonar [55].

- **Miocardio:** Existen diferencias considerables en la estructura y organización de las paredes cardíacas de estos animales. La fina pared del seno venoso está formada por fibras de tejido conectivo y miocitos. Las paredes de las aurículas son también finas, pero poseen una mayor cantidad de fibras musculares que la pared del seno venoso. En el ventrículo el tejido miocárdico está organizado en tres capas: una fina capa longitudinal externa, una capa intermedia más fina y compacta y una capa interna trabeculada.

- **Vasos sanguíneos:** Del ventrículo emergen tres arterias principales: la aorta derecha e izquierda y el tronco pulmonar. Estas arterias y sus tributarias tienen unas finas paredes musculares elásticas que facilitan la dinámica del flujo sanguíneo [56]. El tronco pulmonar está orientado ventralmente y se bifurca en la arteria pulmonar derecha e izquierda con sus prominentes esfínteres musculares (figuras 3 y 4).

La aorta asciende dorsalmente y ligeramente a la derecha del tronco pulmonar. Su rama derecha se arquea dorsalmente hacia ese lado continuando como arteria braquiocefálica, la cual aporta oxígeno a la cabeza, el cuello y las aletas delanteras. Se continúa caudalmente hasta unirse a la aorta izquierda [38]. La aorta izquierda se arquea dorsalmente hacia la izquierda y discurre caudalmente por el cuerpo dando varias ramas viscerales a su paso entre las que se incluyen: cólica, gástrica, mesentérica superior, antes de unirse a la aorta derecha y formar la aorta dorsal [38].



Figura 3: Imagen del pulmón (1), corazón (2), tráquea (3), arteria pulmonar (4) y esfínter de la arteria pulmonar (5) de un ejemplar de *Caretta caretta* durante su necropsia.



Figura 4: Arteria pulmonar de *Caretta caretta* en la que se diferencia dos porciones: su región proximal al tronco pulmonar sin esfínter (1) y su región proximal al pulmón con esfínter (2).

#### 2.4.2 Fisiología cardiovascular:

El control del flujo sanguíneo pulmonar y sistémico a través de mecanismos mediados por derivaciones cumple un papel muy importante dentro de la función cardiopulmonar y la fisiología del buceo en estas especies. Como ha sido descrito previamente, a diferencia del sistema cardiopulmonar de los mamíferos, los flujos pulmonares y sistémicos de estas especies no están morfológicamente separados en circuitos paralelos. El septo ventricular incompleto y el esfínter muscular que presenta cada una de las arterias pulmonares permiten diversificar los flujos (a través de derivaciones centrales) hacia los pulmones o lejos de ellos.

Algunos estudios consideran que la separación entre el flujo pulmonar y el sistémico puede estar más desarrollada en *Dermochelys coriácea* debido a la presencia de un septo ventricular más fuerte, al igual que el esfínter de la arteria pulmonar, compuesto por un mayor número de fibras musculares en comparación con el de *Caretta caretta* [53, 57].

Las derivaciones cardíacas, junto a los niveles basales metabólicos y los patrones intermitentes respiratorios de los reptiles, desempeñan un papel muy importante durante el buceo [58, 59]. Además, y como reafirmamos en la presente tesis, ayudan a minimizar la absorción de nitrógeno durante el buceo [12]. Hasta el momento no existen estudios que hayan medido directamente el flujo sanguíneo cardíaco en tortugas marinas, por lo que se extrapola de otras especies de reptiles de los que tampoco existe mucha bibliografía publicada.

En condiciones normales la sangre de la aurícula derecha entra en el ventrículo y en su mayoría fluye hacia las arterias pulmonares. La sangre que vuelve de los pulmones a la aurícula izquierda es dirigida a la circulación sistémica a través de la aorta. Las derivaciones suponen una redirección de la sangre evitando los vasos pulmonares (derivaciones derecha-izquierda, R-L) y existen las derivaciones izquierdas-derechas (L-R) que devuelven el sistema a las condiciones iniciales. Durante las derivaciones derechas - izquierdas la sangre que debería fluir por el circuito pulmonar es redireccionada hacia el circuito sistémico. Este tipo de derivación se asocia a apneas mientras que las derivaciones izquierdas - derechas suceden durante la ventilación normal. Por lo tanto, las derivaciones son bidireccionales [60]. El grado en el que sucede cada derivación depende de un complejo número de factores interrelacionados entre ellos como ventilación, contractibilidad, resistencia vascular (por ejemplo, la contracción de los esfínteres pulmonares), precarga, postcarga.

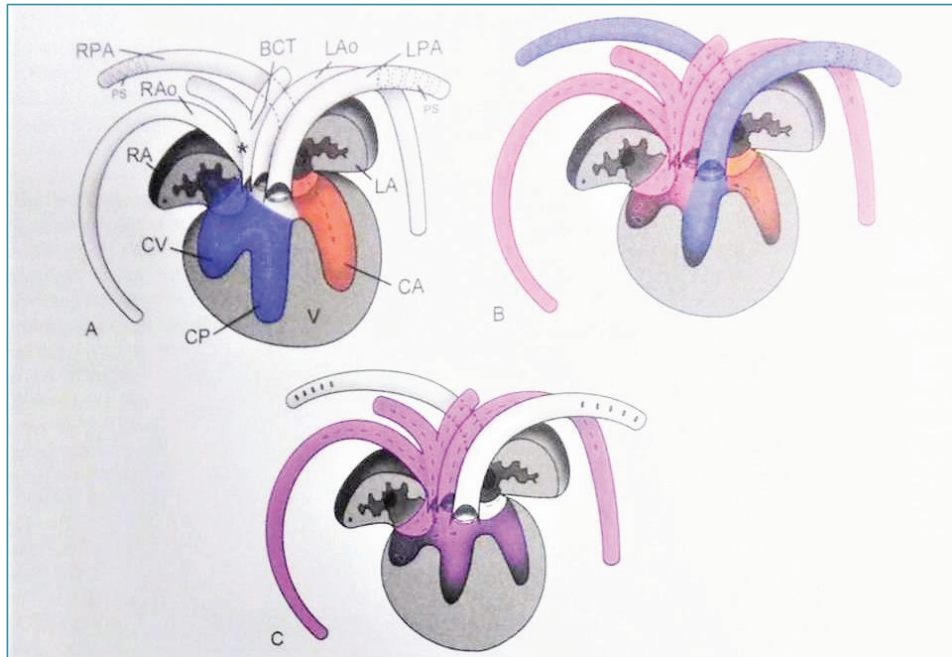


Figura 5: Flujo sanguíneo entre el corazón y los vasos principales. El diagrama ilustra el flujo sanguíneo bajo diferentes circunstancias. Las estructuras anatómicas han sido simplificadas con el objeto de la demostración. El significado de las siglas es el siguiente: arteria pulmonar derecha (RPA), arteria pulmonar izquierda (LPA), esfínter pulmonar (PS), aorta derecha (RAo), aorta izquierda (LAo), aurícula derecha (RA), aurícula izquierda (LA), ventrículo (V), cavum arteriosum (CA), cavum venosum (CV), cavum pulmonale (CP). La base de la aorta derecha (\*) se ramifica inmediatamente en la base del corazón originando el tronco braquiocefálico (BCT) que se curva caudalmente como continuación de la aorta derecha. A- Sístole atrial: La sangre pobre en oxígeno (azul) fluye de la aurícula derecha al ventrículo a través del cavum venoso hasta el cavum pulmonale. La sangre rica en oxígeno (rojo) fluye desde la aurícula izquierda hasta el cavum arteriosum. B- Sístole ventricular: representación simplificada de las rutas que sigue el flujo sanguíneo sin derivaciones y durante la ventilación. Cuando el ventrículo se contrae la sangre pobre en oxígeno fluye del cavum pulmonale al interior de las arterias pulmonares. La sangre oxigenada fluye desde el cavum arteriosum hasta el cavum venosum y de ahí a todo el cuerpo a través de la aorta derecha e izquierda. EL color magenta de la sangre que abandona el cavum venosum representa cierto grado de mezcla de sangres (oxigenada y pobre en oxígeno) dentro del corazón. C- Sístole ventricular con derivacion derecha- izquierda: durante la apnea o el buceo, el esfínter de la arteria pulmonar se contrae, aumentando la resistencia vascular y favoreciendo la eyección hacia la circulación sistémica a través de la aorta. El color morado representa la saturación parcial de oxígeno de la sangre, que ira agotándose a medida que se prolongue la inmersión. (Sea Turtle Health and Rehabilitation 2017).

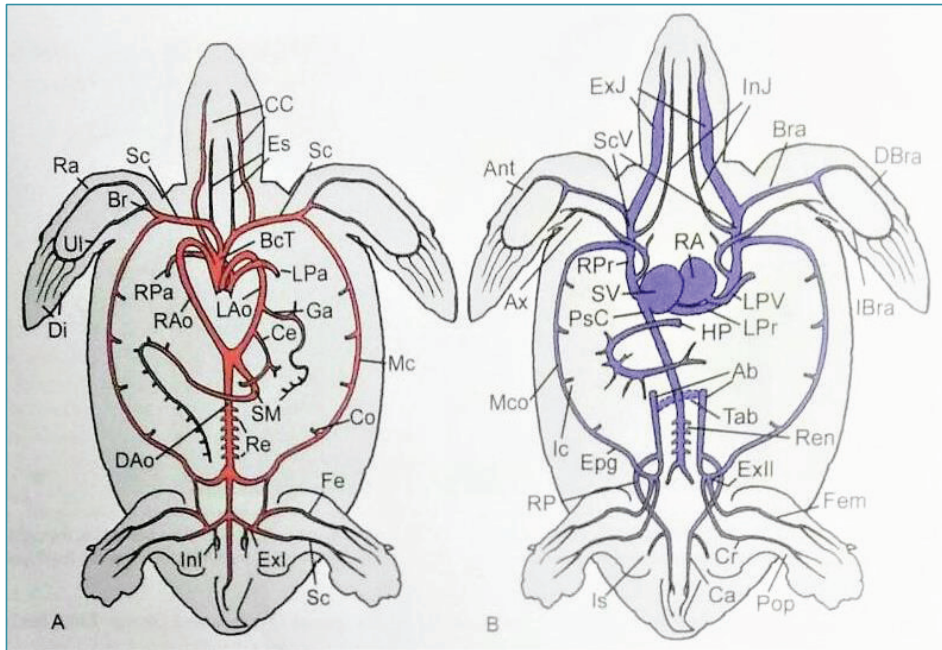


Figura 6: Diagrama de la circulación mayor arterial (A) y de la anatomía venosa (B) (Adaptada de la ilustración Wyneken 2001). El diagrama venoso se ha simplificado y no incluye algunos vasos largos como la vena ácigos, la vena hepática izquierda o el drenaje completo mesentérico y de los vasos del bazo en la vena porta hepática. Las arterias representadas son las siguientes: braquial (Br), tronco braquicefálico (BcT), celiaca (Ce), carótida común (CC), costal (Co), digital (Di), aorta dorsal (DAo), esofágica (Es), iliaca externa (ExI), femoral (Fe), gástrica (Ga), iliaca interna (InI), aorta izquierda (LAo), pulmonar izquierda (LPa), marginocostal (Mc), radial (Ra), renal (Re), aorta derecha (RAo), pulmonar derecha (RPa), isquiática (Sc), mesentérica superior (SM) y ulnar (Ul). Las venas y estructuras asociadas están representadas como: abdominal (Ab), anterobraquial (Ant), axilar (Ax), braquial (Bra), caudal (Ca), crural (Cr), braquial dorsal (DBra), epigástrica (Epg), iliaca externa (ExII), yugular externa (ExJ), femoral (Fem), porta hepática (HP), intercostal (Ic), braquial interna (IBra), yugular interna (InJ), isquiática (Is), precava izquierda (LPr), pulmonar izquierda (LPV), marginocostal (Mco), poplítea (Pop), postcava (PsC o vena hepática derecha), renal (Ren), porta renal (RP), aurícula derecha (RA), precava derecha (RPr), seno venoso (SV), subclavia (ScV) y abdominal transversa (Tab). (Sea Turtle Health and Rehabilitation 2017).

El flujo pulmonar y las derivaciones cardíacas están regulados de forma central vía vagal (sistema parasimpático) innervando corazón, pulmón y arterias pulmonares [56]. Las vías aferentes proceden de quimiorreceptores sensibles a las concentraciones de oxígeno que están situados en el arco aórtico y quimiorreceptores sensibles a las variaciones de CO<sub>2</sub> en los pulmones [56].

El tono vagal es elevado incluso en los reptiles en reposo. Cuando el tono vagal disminuye aumenta la frecuencia cardíaca y se reduce la resistencia pulmonar, lo que reduce o revierte la derivación derecha- izquierda y aumenta la concentración arterial de oxígeno [56, 61, 62]. La frecuencia cardíaca y el flujo pulmonar aumentan generalmente inmediatamente después de que la respiración comience, lo que sugiere que el control mecánico central mediado por un tono simpático elevado es igualmente importante en la función cardiovascular [21, 56, 57, 61, 63-65]. En la presente tesis exponemos preparaciones de diferentes tejidos tanto arteriales como pulmonares para estudiar su respuesta frente a los principales neurotransmisores que los coordinan, los efectos obtenidos por las catecolaminas son importantes ya que la estimulación simpática (respuesta de lucha) pueden tener una serie de efectos sobre las funciones cardiovasculares adaptativas durante actividades tales como el buceo.

Basados en los estudios que miden el flujo pulmonar en tortugas de agua dulce se sabe que durante ventilaciones normales existe una derivación izquierda - derecha [57, 61]. Durante el buceo o los periodos de apnea, la estimulación vagal deriva en bradicardia y un aumento en la resistencia al flujo pulmonar, reduciéndose el flujo de eyección y causando una derivación derecha- izquierda, una respuesta ya tratada y conocida como “respuesta al buceo”. Esta caracterización se obtuvo en sus inicios de estudios que empleaban inmersiones forzadas y que posteriormente se han contrastado en condiciones naturales [58, 59]. Un estudio sobre las derivaciones cardíacas realizadas en *Trachemys scripta* mostró que la derivación derecha - izquierda solo ocurre cuando el animal está sumergido en situación de reposo, no mientras está nadando [66].

- **Circulación coronaria:** No existen estudios específicos sobre ello en tortugas marinas. La mayoría de la información disponible deriva de estudios en tortugas de agua dulce. De ellos cabe destacar que el músculo esponjoso trabecular del corazón recibe sangre oxigenada a medida que esta pasa por el ventrículo [67] (importante destacar que en necropsias en animales con síndrome descompresivo muy severo encontramos burbujas en seno venoso). Además, la derivación cardíaca se sospecha que juegan un importante papel en la oxigenación del miocardio en *Trachemys scripta*, y podría suceder también en otras especies [58].



Respecto a las patologías referentes al sistema circulatorio es importante hablar del síndrome descompresivo. Estos animales se consideraban en un riesgo muy bajo de sufrir esta enfermedad [31] hasta la publicación de estudios más recientes [12] que han demostrado que los animales que se quedan atrapados en las redes de pesca pueden sufrir esta patología. El diagnóstico se realiza teniendo en cuenta los signos clínicos, por medio de pruebas de imagen, hallazgos patológicos y tras su resolución por medio de una cámara hiperbárica, pero su etiología se desconocía hasta la presente tesis.

## **2.5 SISTEMA NERVIOSO**

El sistema nervioso central (SNC) de las tortugas marinas está formado linealmente por el cerebro y la médula espinal. El sistema nervioso periférico (SNP) incluye todos los tejidos nerviosos y estructuras asociadas que se encuentran fuera del SNC. Como en otros vertebrados, los axones viajan juntos a través del SNC formando nervios y se convierten en axones y terminaciones nerviosas en el SNP.

El SNP está formado por pares de nervios que emergen de la médula espinal a través del foramen intervertebral, como en otras especies la región dorsal está compuesta de fibras somáticas y viscerales que contiene fibras motoras también. La región ventral está compuesta por las fibras nerviosas motoras somáticas y viscerales.

Los nervios viscerales trabajan como parte del sistema nervioso autónomo (SNA) con sus componentes simpáticos y parasimpáticos. La estructura básica del SNA se compone de un circuito formado por una fibra nerviosa preganglionar cuyo cuerpo celular está dentro del SNC y su axón realiza la sinapsis con el nervio periférico que inerva el tejido diana [68]. El SNA de los reptiles difiere del de los mamíferos en que las fibras nerviosas viscerales autónomas no segregan de forma automática en las regiones “toraco lumbar” y “craneo-sacral”. El SNA no está muy bien descrito en tortugas marinas, ni en muchos reptiles, por lo que se extrapola de lo estudiado en lagartos.

Las fibras simpáticas forman una cadena corta de ganglios bilaterales (tronco simpático) adyacente a la columna vertebral, con fibras postganglionares largas que llegan a las vísceras. Las fibras preganglionares craneales inervan corazón, pulmones y vísceras craneales mientras que las fibras mediales y caudales inervan el sistema digestivo, los vasos sanguíneos periféricos, bazo y sistema urogenital.

La estimulación parasimpática es colinérgica como en otros vertebrados y entre otras acciones produce contracción de las vías aéreas y disminuye la frecuencia cardíaca. La inervación vagal de los músculos viscerales, estómago y pulmones está bajo control adrenérgico inhibitorio. La inervación vagal del corazón en los reptiles es de dos formas: vía fibras colinérgicas inhibitorias parasimpáticas y fibras adrenérgicas [69].

El SNA se clasifica básicamente en dos sistemas: el sistema nervioso parasimpático que tiene a cargo los aspectos vegetativos de protección, conservación y restauración ya que por su actividad regula la actividad cardíaca, favorece la digestión y absorción y los procesos anabólicos. Y el sistema nervioso simpático que tiene a cargo los mecanismos de emergencia y la regulación autonómica masiva.

Para estudiar la respuesta del esfínter de la arteria pulmonar a los diferentes neurotransmisores es importante conocer los principales mediadores tanto del sistema simpático como parasimpático.

Las neuronas del Sistema Nervioso Autónomo se pueden clasificar, de acuerdo con el neurotransmisor liberado en la sinapsis, en:

1. **Colinérgicas:** Aquellas que liberan acetilcolina.
2. **Noradrenérgicas:** Aquellas que liberan noradrenalina.

## 2.6 SÍNDROME DESCOMPRESIVO

Hasta la fecha, esta enfermedad solo ha sido reportada en *Caretta caretta* capturadas accidentalmente en el mediterráneo.

En *Dermochelys coriacea* sin signos clínicos también se ha diagnosticado embolia gaseosa, así como en tortuga verde, ambas en el mediterráneo [54]. La investigación en otras regiones del planeta es de vital importancia para comprender todos los factores que pueden influir en esta enfermedad, como tipo de pesca, profundidad, área geográfica, condiciones oceánicas, especie y características individuales. Esta patología debe estar dentro de los diagnósticos diferenciales de cualquier tortuga marina que haya sido capturada por redes de pesca a profundidad y llevada a superficie de forma involuntaria. Hasta el momento, lo comprobado es que no se requieren profundidades muy elevadas para desarrollar síndrome descompresivo en estos animales puesto que hay casos reportados capturados a 10 metros de profundidad.

El descubrimiento reciente de esta enfermedad sugiere numerosas preguntas sobre el efecto de las capturas bajo el agua de estos animales y la necesidad de medidas para mitigarlo. Por ejemplo, en los animales letárgicos o inmóviles capturados por barcos de pesca se recomienda dejarlos en una posición inclinada con la cabeza hacia abajo (presuponiendo que sufre un ahogamiento), pero este tratamiento si se trata de síndrome descompresivo y no ahogamiento podría no favorecer sino empeorar el cuadro clínico.

### **2.6.1 Etiopatogenia:**

Hasta la fecha el síndrome descompresivo solo ha sido estudiado en ejemplares de *Caretta caretta* que han llegado al centro de recuperación Arca del Mar tras haber sido capturados en redes de arrastre y trasmallo a tan solo 10 metros de profundidad. La duración de la inmersión y la respuesta de lucha al quedar atrapadas son factores importantes, no solo la profundidad. La influencia de otros factores ambientales como la temperatura del agua, la temperatura del aire, la velocidad de subida de las redes o incluso factores individuales (tamaño, condición corporal, estado sanitario, inmersiones previas, etc.) necesitan ser estudiadas.

Los resultados obtenidos hasta ahora y los que se exponen en la presente tesis resultan como producto de una importante colaboración entre pescadores y personal encargado de la rehabilitación y conservación de estas especies.

### **2.6.2 Clínica:**

Al igual que en el síndrome descompresivo humano [11] pueden pasar varias horas hasta mostrar signos clínicos. Algunas tortugas parecen normales cuando son capturadas y posteriormente desarrollan signos clínicos hasta incluso la muerte, que sucede en casos moderados en las siguientes 48- 72 horas si no son tratadas. Entre los signos clínico se incluyen la hiperactividad, la falta de respuesta a estímulos, extensión prolongada del cuello y apertura de la boca (sugestiva de disnea), las aletas posteriores están de forma persistente recogidas hacia el cuerpo, paresia e incluso parálisis.

Estos animales muestran tres tipos diferentes de comportamiento inicialmente o en los minutos en que llegan a superficie: algunos están aparentemente normales, otros están hiperexcitados con signos neurológicos y otros están en estado comatoso. Se han descrito varios estados de embolia gaseosa asociados a estos tres estados iniciales, ya que la severidad de la embolia gaseosa no tiene por qué ser aparente inmediatamente. En general existe una progresión de animales activos a estuporosos en aquellos que presentan un cuadro de embolia gaseosa desde moderada a severa. En la mayoría de casos las tortugas están afectadas por otras lesiones derivadas de la captura, incluyendo ahogamiento (con y sin neumonía por aspiración), hipoxia, acidosis, alteraciones electrolíticas y miopatías debidas al sobreesfuerzo. Los hallazgos clínicos muestran el grado de embolia gaseosa, su posible localización y severidad. Los casos leves son asintomáticos mientras que los casos con embolia gaseosa más extendida muestran un grado de síndrome descompresivo que se caracteriza por severos signos neurológicos como extensión crónica cervical y apertura de boca, retracción de las aletas, parálisis espinal, disnea, pérdida de nocicepción y sensibilidad superficial hasta incluso parálisis completa. Horas después de la captura pueden presentar flotabilidad positiva y natación errática, cuando los animales no son tratados y se les mete en el agua.

### 2.6.3 Diagnóstico:

El diagnóstico clínico del síndrome descompresivo en estas especies se basa en su historia clínica (tipo de arte de pesca, duración, condiciones iniciales y progresión clínica), en los signos clínicos observables y en pruebas diagnósticas complementarias.

La evaluación del sistema respiratorio es un aspecto crítico. Muchos de los animales varados son encontrados en la superficie, con un riesgo asociado a haber aspirado agua, esta confirmación es un paso clave en su posterior tratamiento. Como ya hemos comentado antes, la frecuencia respiratoria en estas especies puede variar. La respuesta más normal cuando se realiza una exploración física es que el animal intente escapar con su correspondiente aumento de la frecuencia respiratoria. En algunos de los casos de enfermedad descompresiva en animales capturados por redes de pesca los pescadores reportaron frecuencias respiratorias elevadas y animales que, incluso estando solos en la caja de transporte, estaban en continuo movimiento. Esto probablemente se deba al dolor derivado de las lesiones que produce la enfermedad descompresiva.

Entre estas pruebas complementarias son de fundamental utilidad las pruebas de imagen como la radiografía y la ecografía para valorar la severidad de la embolia gaseosa.

El **estudio radiográfico** es el método semicuantitativo más simple de diagnóstico por imagen y a su vez el más útil para evaluar el grado de embolia gaseosa y establecer el grado de enfermedad. El gas intravascular se observa como imagen radiolúcida dentro de los vasos y del corazón.

En los casos severos los pulmones están colapsados de forma severa y se observa una evidente reducción del campo pulmonar y un aumento de la opacidad de los mismos. En casos leves de embolia gaseosa la proyección laterolateral es la más sensible para detectar el gas en la zona de proyección renal (figura 8). En los casos leves el gas se localiza de forma primaria en los vasos renales y se observa mejor en la proyección laterolateral. Los vasos ilíacos externos se ven afectados en casos más graves y se observan mediante radiografía a través de la proyección dorsoventral. En esos casos es posible detectar gas dentro de los vasos marginales del hígado. En los casos más severos el gas se ha diseminado y podemos localizarlo en precavas, postcavas, venas hepáticas y cámaras cardíacas.

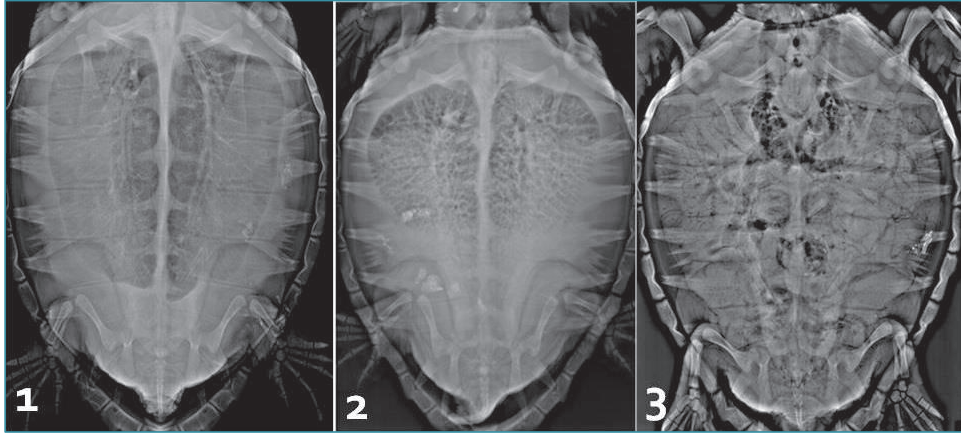


Figura 7: Radiografías dorso ventrales de diferentes ejemplares de *Caretta caretta*. Imagen normal (1), neumonía (2), síndrome descompresivo (3).

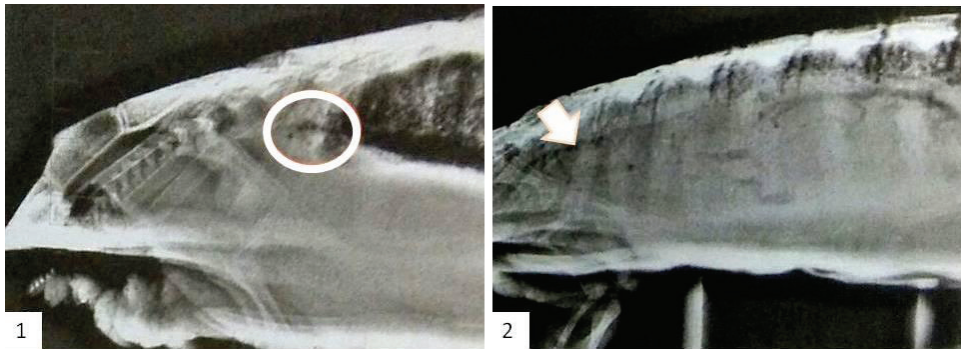


Figura 8: Radiografías laterolaterales de un ejemplar de *Caretta caretta* con embolia gaseosa leve (1) y severa (2), el gas está señalado dentro de un círculo y con una flecha respectivamente.

El **diagnóstico ecográfico** es el método más sensible para determinar la presencia de burbujas de gas incluso en casos leves de embolia gaseosa. Los riñones y sus vasos son las estructuras diana donde localizar estas burbujas. Estas burbujas son visibles como puntos hiperecogénicos con artefactos asociados comúnmente denominados como “colas de cometa” (figuras 9 y 10). Además, durante el estudio ecocardiográfico los casos leves-moderados muestran burbujas de gas en las cámaras cardiacas y en los principales vasos,

especialmente en el atrio derecho (figuras 11 y 12). En casos de embolia gaseosa moderada la acumulación del gas es claramente visible por medio de la ecografía renal y los vasos asociados, en ambos atrios y en el hígado. El estudio ecográfico es menos útil en los casos severos puesto que la presencia de gas es en tal cantidad que dificulta la realización de la prueba y la correcta visualización de los tejidos.

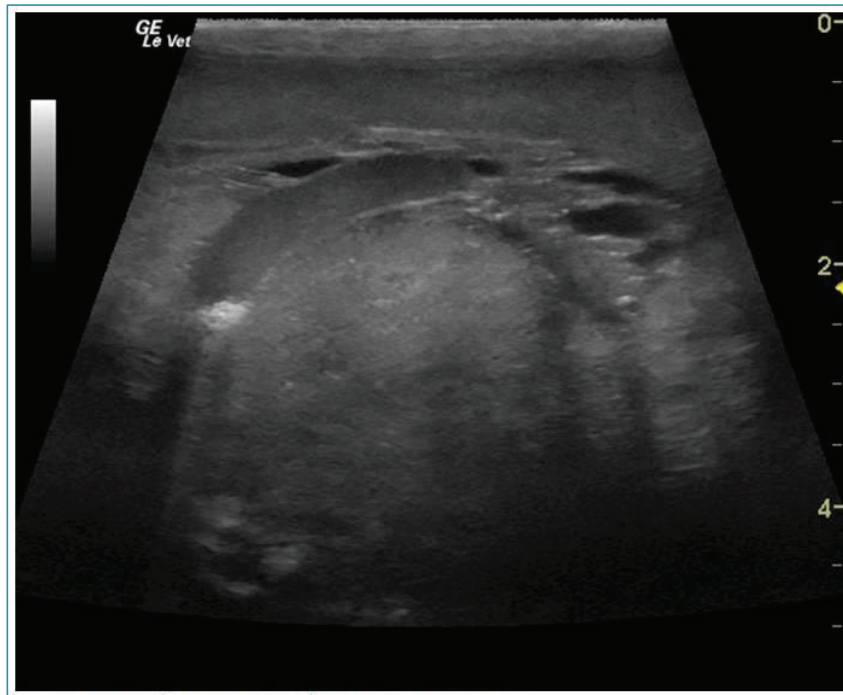


Figura 9: Imagen ecográfica vascular en *Caretta caretta* en la que se distingue el gas intravascular

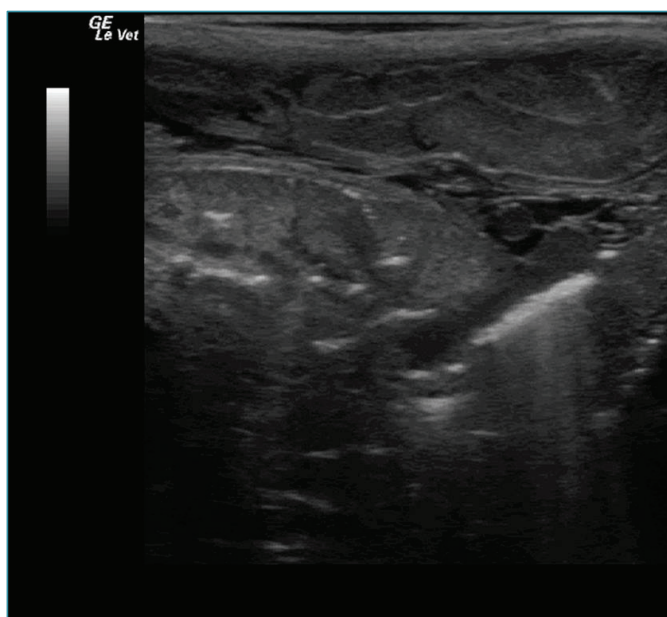


Figura 10: Imagen ecográfica renal en *Caretta caretta* en la que se distingue el gas intravascular (regiones hiperecogénicas) con sus característicos artefactos en “colas de cometa”.

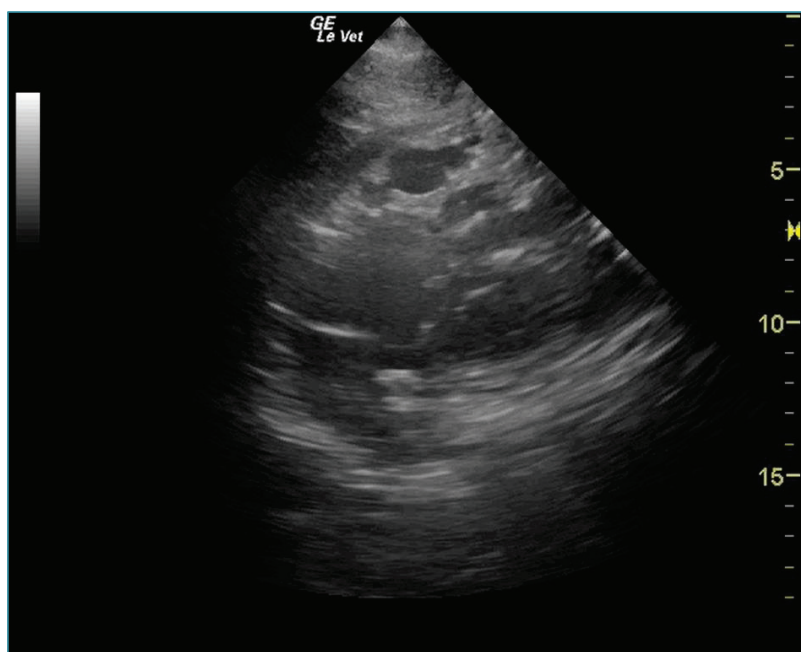


Figura 11: Imagen ecográfica cardiaca en *Caretta caretta* en la que se distingue el gas dentro de las diferentes cámara



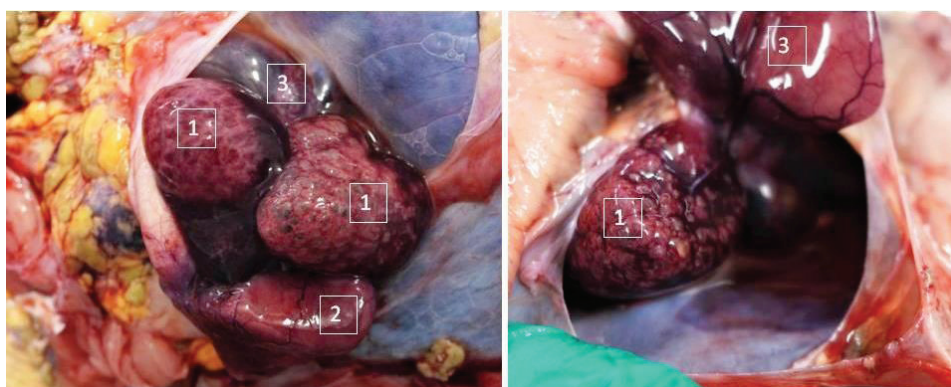


Figura 12: Imagen procedente de una necropsia de un ejemplar de *Caretta caretta* con embolia gaseosa. En ambas imágenes se diferencia el gas dentro de las cámaras cardiacas. Aurículas (1), ventrículo (2) y seno venoso (3).

El criterio para categorizar la embolia gaseosa se establece en leve, moderado y severo según los hallazgos radiográficos (tabla 2). Los signos clínicos del síndrome descompresivo se asocian con grados de moderados a severos de embolia gaseosa.

Severidad (embolia gaseosa)	Criterio
Leve	Pequeña cantidad de gas en la zona de proyección renal. Identificable por ecografía o en la proyección radiográfica L-L. en algunos casos se puede detectar gas intrarrenal en la proyección DV.
Moderado	Importante presencia de gas en la región renal, claramente identificable por ecografía, proyección L-L y DV. Se observa también la presencia de gas en vasos celómicos periféricos y en el hígado (proyección DV). Por medio de la ecografía se observa abundante cantidad de gas en los vasos renales, parénquima renal y cámaras cardiacas.
Severo	Abundante gas fácilmente visible en riñón, hígado, vasos sistémicos principales y cámaras cardiacas (incluso en proyección DV) El campo pulmonar no es visible en la proyección DV debido al abundante contenido en gas de los vasos y el hígado. No se puede realizar ecografía ya que el gas interfiere.

Tabla 2: Criterios para categorizar el embolismo gaseoso en animales vivos o recién muertos en base a la cantidad y distribución del gas encontrado en las pruebas de imagen realizadas.

Otro método para evaluar el sistema respiratorio es aquel que estudia la funcionalidad pulmonar, donde destaca la **espirometría**. Existen muy pocos estudios de este tipo en tortugas marinas y la mayoría de ellos en trabajos de investigación sobre su fisiología respiratoria. Esta técnica puede ser potencialmente útil en el diagnóstico de esta enfermedad en centros que no dispongan de radiografía o ecografía.

La **tomografía axial computerizada** (TAC) es el método de elección ya que localiza y cuantifica el gas con mayor precisión en comparación con los métodos descritos anteriormente, pero es muy poco accesible a la mayoría de centros de recuperación y requiere de anestesia o sedación, que en animales comatosos no sería lo indicado. Las figuras 13 y 14 muestran algunos ejemplos. La **resonancia magnética** también ofrece un potencial adicional para evaluar el daño tisular y las lesiones crónicas en animales que sobrevivan a un caso de embolia gaseosa. Las alteraciones anatómicas, falta de circulación/perfusión de los tejidos o incluso la actividad metabólica puede aportar información sobre la magnitud y alcance del daño.

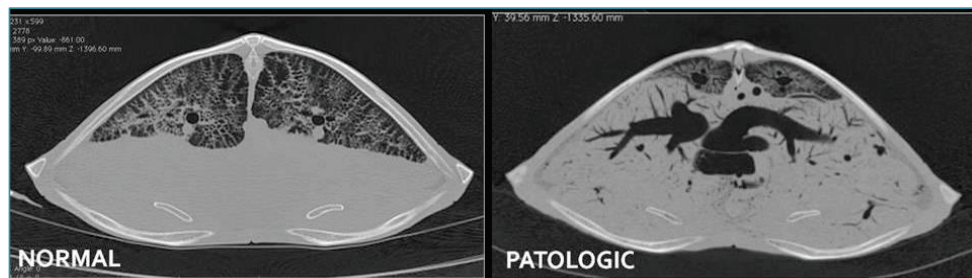


Figura 13: Imagen realizada por tomografía axial computerizada de la región celómica craneal de *Caretta caretta*. En la imagen se distinguen los pulmones, imagen normal. La imagen de la derecha pertenece a un animal con embolia gaseosa en el que se distingue el gas dentro de las cámaras cardiacas y principales vasos, así como se observa una marcada reducción del campo pulmonar.

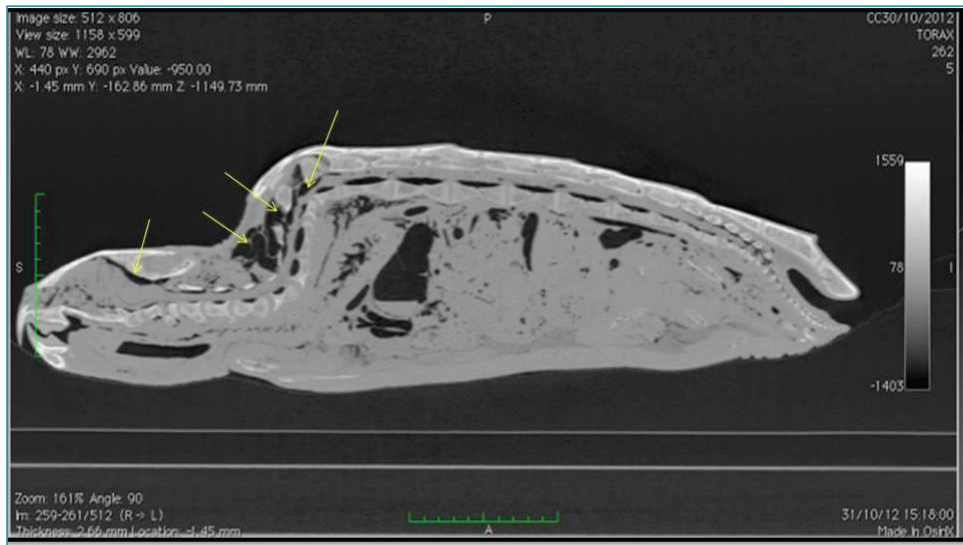


Figura 14: Imagen realizada por tomografía axial computerizada. Corte longitudinal de un ejemplar completo de la especie *Caretta caretta*. En la imagen se distinguen distintas localizaciones con gas próximas a la médula espinal y sistema nervioso central (flechas amarillas).

Además, en estos animales podemos tomar muestras de sangre a través del seno cervical dorsal, principalmente, como se observa en la Figura 15.



Figura 15: Ejemplar de *Caretta caretta* en el que se visualiza la embolia gaseosa durante la extracción de sangre del seno cervical dorsal.

Con estas muestras podemos realizar hemogramas en los que evaluar parámetros como el hematocrito, la hemoglobina y pruebas bioquímicas con las que conocer el estado y funcionamiento general de diversos órganos como el hígado o los riñones. Las **analíticas sanguíneas** también presentan modificaciones derivadas de la alteración producida por las burbujas, la obstrucción vascular y hemorragia. Siendo éstas incluso visibles en casos muy severos al realizar la toma de muestra (Figura 15).

Como se ha descrito en humanos, los efectos secundarios incluyen daño endotelial, extravasación plasmática, y hemoconcentración [11]. Las alteraciones bioquímicas más características observadas incluyen desde un aumento de moderado a severo del ácido úrico, alteraciones electrolíticas (fundamentalmente hiponatremia e hiperkalemia). Niveles elevados de creatín quinasa (CK) y una leve elevación de la enzima lactato deshidrogenasa (estas dos últimas se observan los días posteriores a la captura). Aun así es difícil discernir qué alteraciones se deben a la embolia gaseosa de aquellas lesiones derivadas de la captura y la inmersión forzada.

#### **Diagnóstico post mortem:**

El diagnóstico veraz post mortem es complicado si se desconoce una historia de enfermedad descompresiva previa. El gas difunde rápidamente a los vasos durante la disección y las bacterias también pueden producirlo postmortem. Por ello, la sospecha de enfermedad descompresiva en animales que no estén en estado de descomposición ha de basarse en la presencia de gas intravascular (distribuido en los lugares indicados en los ejemplares vivos) en combinación con la evidencia de isquemia, congestión o hemorragias y tras excluir otras causas de muerte.

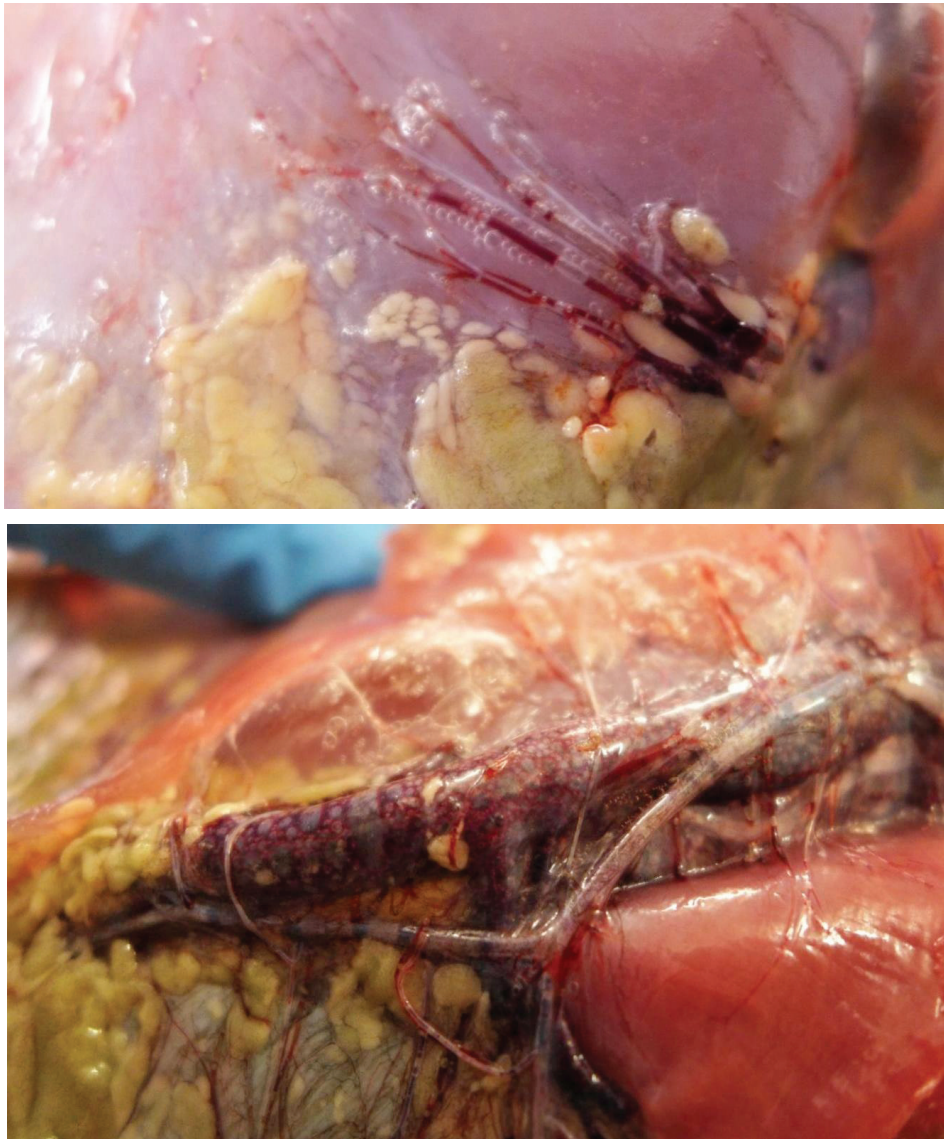


Figura 16: Gas intravascular en diferentes localizaciones en un ejemplar de *Caretta caretta*.

Durante la necropsia de estos casos debemos tener en cuenta ciertas consideraciones especiales para no perder acúmulos de gas patológicos en los diferentes tejidos. Como es sabido, las burbujas de gas se pueden crear como artefacto durante la disección o como producto de descomposición de las bacterias.

Es altamente recomendado realizar radiografías o escáner de los animales con sospecha antes de realizar la necropsia. La composición de los gases que se observan durante la necropsia se pueden analizar siguiendo protocolos ya descritos [47]. Es difícil detectar grados leves de embolia gaseosa durante la necropsia. Las zonas donde mejor se localiza este gas durante la necropsia son: atrios, seno venoso, vasos mesentéricos y vasos renales.

En los casos severos el gas distiende casi todas las estructuras vasculares, pero aun así se localiza mejor en el abdomen medio en los vasos mesentéricos, gástricos, pancreáticos, hepáticos y renales así como en la postcava y en el resto de vasos principales. En estos casos, las cámaras cardiacas y los vasos, especialmente la aurícula derecha y el seno venoso, están muy distendidas por el gas, de tal modo que es hasta reconocible en los vasos coronarios.

En los casos muy severos el bazo está distendido por el gas. Macroscópicamente los riñones pueden presentar áreas multifocales enrojecidas con una marcada congestión y/o hemorragia. Otro hallazgo son lesiones congestivas segmentarias en la mucosa intestinal. Los pulmones de algunos animales están parcialmente colapsados, existiendo enfisema en sus regiones craneales.

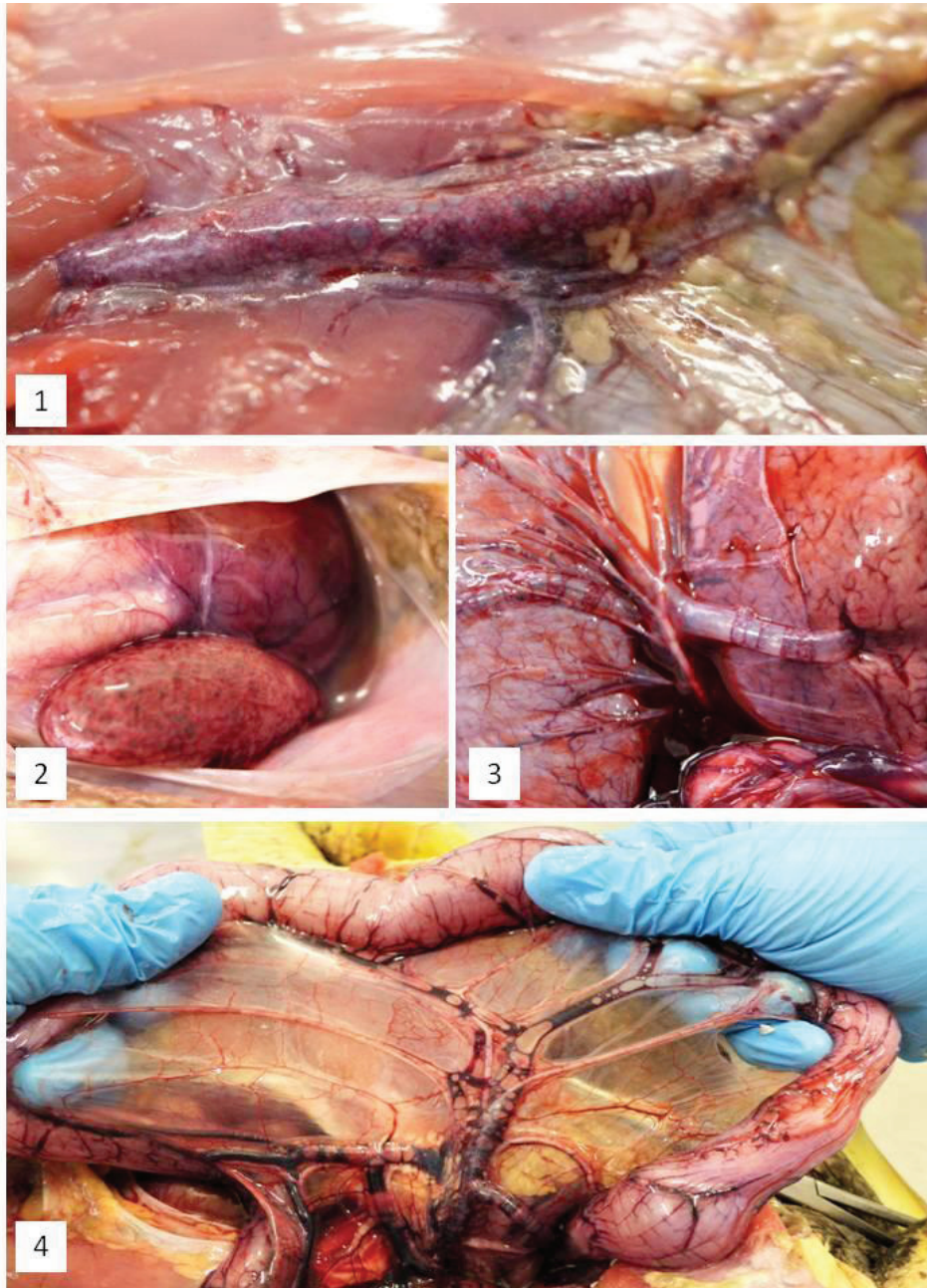


Figura 17: Hallazgos de gas intravascular durante la necropsia de un ejemplar de *Caretta caretta* en diferentes localizaciones: postcava (1), seno venoso (2), vasos renales (3), vasos mesentéricos (4).

Entre los hallazgos histopatológicos podemos destacar desde moderada a severa congestión multisistémica con presencia intravascular de burbujas en múltiples órganos como los pulmones, hígado, riñón y corazón. También se puede visualizar edema perivascular y hemorragia en los diferentes tejidos. Otros hallazgos histológicos no específicos también son compatibles, tales como necrosis miocárdica multifocal aguda, degeneración vacuolar, edema pulmonar, degeneración hepatocelular microvacuolar difusa, edema sinusoidal, etc.

## **2.6.4 Tratamiento y pronóstico:**

### **2.6.4.1 Tratamiento:**

No existen opciones de tratamiento efectivo en el barco cuando son capturadas. En los animales con embolia gaseosa de media a severa el único tratamiento efectivo es la recompresión bajo terapia rica de oxígeno a elevada presión dentro de una cámara hiperbárica. De hecho, la respuesta al tratamiento es la única forma de conformar el diagnóstico de síndrome descompresivo ya que desaparecen todos los signos clínicos y se produce la eliminación del gas. Debido a la gravedad de esta patología ha de ser tratada lo antes posible para maximizar las posibilidades de supervivencia y minimizar el daño tisular producido por la embolia gaseosa dentro de órganos vitales como riñones, corazón o sistema nervioso central.

Previo al tratamiento hiperbárico se recomienda administrar un tratamiento de shock que dependerá de la severidad de los signos clínicos. Entre ellos está la administración intravenosa de fluidos, estimulantes respiratorios, analgésicos o suplementación respiratoria de oxígeno. En los estados comatosos es importante permeabilizar la vía respiratoria a través de un tubo endotraqueal.

Las cámaras hiperbáricas que existen hasta la actualidad no permiten la ventilación mecánica del paciente dentro de la cámara, por lo que el punto para iniciar el tratamiento es cuando el animal ventila por sí mismo. En un futuro si los animales pueden ser tratados en cámaras en las que puedan ser ventilados mecánicamente los resultados serán mejores.





Figura 18.:Cámara hiperbárica del centro de recuperación Arca del Mar (Oceanográfico, Valencia) empleada en el tratamiento de tortugas marinas con enfermedad descompresiva.

La mayoría de tratamientos hiperbáricos en medicina humana son de 5 horas y la máxima presión que alcanzan es de 1,8 atm relativas (2,8 atm) [11]. En ellas los gases terapéuticos se alternan entre oxígeno puro y aire atmosférico. Además, se pueden modificar las presiones durante el tratamiento y los porcentajes de los gases dentro de la cámara según el criterio del médico especialista. Al inicio los protocolos propuestos en medicina humana dieron buenos resultados al tratar tortugas marinas, pero en algunos pacientes quedaban restos de gas intravascular que no había sido eliminado tras 5 horas de tratamiento. Por esto se decidió revisar los protocolos y ajustarlos a las necesidades de estos nuevos pacientes basándonos en sus características anatómicas y fisiológicas. Una de las primeras medidas fue prolongar el tiempo del tratamiento, establecido actualmente en unas 14-16 horas. De esta forma permite una completa resolución de la embolia gaseosa. Además, y en contra de los protocolos de humana, el gas empleado con tortugas marinas es oxígeno puro. Sería ideal alternar fases de oxígeno puro con ciclos de aire atmosférico, pero hasta el momento no hay ninguna cámara capaz de realizarlo que se utilice para el tratamiento de estas especies. Durante las dos primeras horas se mantiene una presión de 1,8 atm relativas que comenzará a disminuir gradualmente durante las siguientes 4 horas hasta llegar a 0,9 atm relativas, donde la presión se mantiene estable durante las siguientes 6 horas. La presión se reduce gradualmente hasta 0 atm relativas durante las dos últimas horas.

Es esencial observar la respiración de los animales durante el procedimiento, ya que la apnea unida a una rápida descompresión puede degenerar en barotrauma.

#### **2.6.4.2 Pronóstico:**

Las tasas de supervivencia dependen de la severidad de los signos clínicos a su llegada, la cantidad total de gas y sus localizaciones, el tiempo en la cámara hiperbárica y la evidencia o no de neumonía por aspiración. Si no existen más complicaciones asociadas (tales como ahogamiento, trauma, enfermedades anteriores, etc.) los casos leves sobreviven incluso aunque no se aplique tratamiento médico. Las pequeñas cantidades de gas en la zona de proyección renal son reabsorbidas en las siguientes 24 a 48 horas. Los casos moderados y severos generalmente mueren si no reciben tratamiento hiperbárico de oxígeno. En los casos con embolia gaseosa moderada las tortugas muestran inicialmente un comportamiento hiperactivo durante las primeras horas tras la captura, pero mueren en las 48- 72 horas posteriores si no son tratadas. Los casos severos normalmente mueren en las primeras 6-12 horas tras alcanzar la superficie, normalmente durante el transporte al centro de recuperación. El tiempo hasta recibir el tratamiento hiperbárico es un factor limitante en la supervivencia de estos animales. Además de la supervivencia inicial, no se conoce mucho como pueden afectar las lesiones crónicas ni existen estudios a día de hoy en estas especies. Aun así se han observado lesiones histopatológicas en corazón, riñón y sistema nervioso central.

En el caso de tortugas marinas que han sufrido síndrome descompresivo cabe señalar que el estudio de la mortalidad tras su recuperación y liberación es muy complicado. El seguimiento vía satélite de estos individuos resulta la manera actual validada que parece más eficaz, pero es muy cara, el número de muestras es limitado y la interpretación de los datos no es en absoluto sencilla.

#### **2.6.5 Prevención:**

Ninguna medida para mitigar la captura accidental es 100% efectiva. Pero es importante que los pescadores trabajen de nuestro lado y sepan manejar y transportar estos animales hasta el centro de recuperación más cercano de forma rápida y eficaz.

Además, de todos lo expuesto se comprende que la supervivencia de estas especies cuando se quedan atrapadas bajo el agua esté comprometida. En el capítulo de interacción pesquera desarrollaremos más este punto, pero como dato, en Estados Unidos la interacción pesquera se considera la causa principal de muerte de estas especies.

Finalmente, es un objetivo mundial reducir la muerte de estos animales debido a la interacción pesquera. Para ellos debemos conocer perfectamente cómo el estrés producido por esta interacción puede llegar a matar a estas especies.



**CAPÍTULO 3**  
**INTERACCIÓN PESQUERA**



La **captura accidental** por artes de pesca es una de las mayores amenazas para la población mundial de tortugas marinas [70-74]. A pesar de que los efectos globales son difíciles de cuantificar, algunos sistemas de pesca han mostrado efectos significativos sobre ciertas poblaciones concretas. Entre los ejemplos cabe destacar los sistemas de palangre de superficie en el mediterráneo, la pesca artesanal en Baja California y Oriente Asiático o los sistemas de arrastre en el pacífico oriental [72, 74]. Entre 1990 y 2007 se estimó una captura accidental de 346.500 ejemplares al año con una mortalidad anual estimada de 71.000 animales [73]. Además, estas especies ya no son capturadas de forma intencionada para consumo.

Dependiendo del tipo de arte de pesca e interacción estos animales pueden o no sobrevivir. Nos encontramos con casos que mueren inmediatamente o tras un periodo muy breve post captura (por ejemplo, por ahogamiento o desangradas debido a la perforación de un gran vaso por un anzuelo) o animales que mueren semanas o incluso meses después de la captura (infecciones generalizadas, alteraciones en la flotabilidad, lesiones musculoesqueléticas crónicas). El destino de estos animales depende no solo de los métodos de pesca sino también del manejo posterior que se realice con ellos. En ocasiones el desenlace de la interacción también depende de factores externos como condiciones medioambientales, opciones de tratamiento veterinario o de la presencia y densidad de depredadores en la zona.

Las capturas accidentales se producen tanto con barcos comerciales, sistemas de pesca artesanal y barcos de recreo. Estos animales pueden interaccionar con los sistemas de pesca de cinco formas diferentes (que no son exclusivas mutuamente):

- Atrapadas
- Enredadas
- Inmersión forzada
- Durante el esfuerzo por escapar a través de los sistemas de exclusión
- Trauma directo

Los principales efectos derivados de esta interacción incluyen: lesiones físicas, ahogamiento, trastornos metabólicos, síndrome descompresivo y lesiones musculares debidas a la extenuación.

Entre los impactos producidos sobre estas especies como consecuencia de la interacción pesquera nos centraremos en el síndrome descompresivo reportado en animales capturados en el mediterráneo.

Los ecosistemas marinos están afectados mundialmente por la acción antropogénica y, de todos los factores de impacto que sufren, la pesca es una de las causas más importantes de la reducción de muchas poblaciones de animales marinos en todo el mundo, junto con el cambio climático [75, 76]. Pero sus efectos se extienden más allá de las especies comerciales, por lo que la pesca ha causado también la reducción de poblaciones de especies no objetivo o sin interés comercial [77, 78] la captura de las cuales en muchos casos incluso puede causar grandes molestias a los mismos pescadores. Son las llamadas capturas accidentales [79], debidas sobre todo a las características de muchos artes de pesca, que al ser poco selectivos pueden llegar a pescar cualquier otra especie que comparta hábitat y alimento con las especies comerciales objetivo de la pesquería.

En este sentido, los grandes vertebrados marinos son unos de los grupos más afectados por la interacción con la pesca y las capturas accidentales son, a menudo, la amenaza más grave para su conservación [71, 80, 81]. Así, gran cantidad de especies de mamíferos marinos, elasmobranchios, aves marinas y tortugas marinas son capturadas accidentalmente en todo el mundo, y como consecuencia sus poblaciones se han visto drásticamente reducidas [73, 74].

Además, las capturas accidentales pueden conllevar consecuencias negativas no sólo para la biodiversidad, sino también para el ecosistema, ya que pueden afectar a la dinámica trófica de los sistemas marinos. Por este motivo, en los últimos años, la investigación y estudios sobre capturas accidentales de grandes vertebrados marinos ha aumentado exponencialmente [82], contribuyendo a una mejora del conocimiento en cuanto a las especies más afectadas y la magnitud relativa de la captura accidental en gran escala [71, 73].

En el caso de las tortugas marinas estas se ven afectadas por una variedad de factores diferentes, algunos naturales y otros causados por actividades humanas, incluidas las



operaciones de pesca. Las tortugas marinas son particularmente vulnerables a la captura accidental debido, precisamente, a su carácter migratorio: pudiendo llegar a recorrer hasta 1.000 km de distancia [83], y en sus características biológicas: maduración sexual en edades avanzadas, vida larga y bajo rendimiento reproductivo, es decir, poseen unos ciclos vitales realmente complejos y dilatados en el tiempo [53]. Por este motivo, prácticamente todas las especies de tortugas marinas se encuentran actualmente amenazadas y, aunque en algunas zonas hay poblaciones consideradas estables, mayoritariamente todavía hay muchas poblaciones en todo el mundo que sufren una elevada mortalidad generada por la pesca accidental o la explotación directa [73, 74, 82, 84, 85], por lo que se han visto gravemente reducidas e, incluso, algunas especies están consideradas en peligro crítico de extinción [71].

Las tortugas marinas pasan la mayoría de su tiempo a profundidades de unos 40 metros [86], lo que sugiere que las interacciones sucedan con mayor incidencia en aguas superficiales hasta 40 metros y menos probable a mayor profundidad.

La temperatura también parece jugar un papel importante ya que aumenta el metabolismo de estas especies, donde se ha observado una mayor interacción. Aumentando también su frecuencia de interacciones. Del modo contrario en invierno están más inactivas [30, 87] y es más limitada su capacidad de evadirse de las redes como las de arrastre [12, 31, 88] lo que aumenta su incidencia.

La agregación estacional, los puntos calientes o áreas de fidelidad corresponden con usos biológicos y ecológicos de esas regiones por estas especies [89], esto ayuda a predecir áreas de riesgo e identificar localizaciones especialmente importantes para las poblaciones de estos animales.

El número total de tortugas marinas capturadas globalmente [71, 73, 74] y el porcentaje exacto de muertes asociadas [31] aún no están claros debido principalmente a la falta de información estricta sobre la cantidad total de embarcaciones (especialmente sobre embarcaciones de pequeña escala)[73, 74] y el complejo seguimiento de los animales capturados vivos que son devueltos directamente al mar [71]. De 1990 a 2008, se

reportaron 85.000 tortugas capturadas accidentalmente en todo el mundo, pero se estima que la verdadera captura total de tortugas es al menos dos veces mayor [73, 74].

En el Mediterráneo occidental, se han reportado altos niveles de captura accidental de tortugas marinas [90]. La mayoría de las tortugas capturadas son de la especie *Caretta caretta*. Solo en la cuenca del Mediterráneo, se captura un mínimo estimado de 132.000 tortugas por año, de las cuales un mínimo de 44.000 finalizan con la muerte de los animales [91, 92]. Pero, precisamente en las estimaciones de la mortalidad posterior a la captura existe una gran brecha de conocimiento [93, 94], siendo estos datos esenciales para comprender mejor el impacto real que los actuales sistemas de pesca pueden estar teniendo sobre las poblaciones de tortugas y para obtener información directamente más útil para la protección de estas poblaciones [71].

La presente tesis revela una nueva condición que puede comprometer la supervivencia posterior a la liberación de individuos capturados accidentalmente si estos animales no reciben asistencia veterinaria.

En el caso del mediterráneo la plataforma continental es muy amplia y las tortugas marinas son altamente vulnerables a los arrastreros de fondo que operan en la plataforma continental [95-97] porque allí se encuentran la mayor parte del tiempo cuando están en la plataforma [96, 98]. Esto es particularmente frecuente en invierno y principios de primavera, cuando la temperatura del mar es más baja y es más difícil para las tortugas evitar las redes de arrastreros de fondo, ya que descansan en un estado latente en el fondo marino y mantienen los costos energéticos al mínimo [30, 87]. Además, las áreas con menos de 50 m de profundidad están cerradas a los arrastreros de fondo en la mayor parte de España (DOGC 2000, 2006). Se han sugerido varias propuestas para tratar este problema de conservación, como los cierres estacionales o el cierre a la pesca de arrastre de fondo en las áreas con mayor abundancia de tortugas marinas. La presente tesis pretende aportar nuevos datos sobre las enfermedades derivadas de la interacción pesquera con el fin de buscar medidas que favorezcan una pesca aún más sostenible.

Los artes de pesca más implicados en la captura accidental de tortugas bobas en la zona mediterránea son los palangres a la deriva y los arrastreros de fondo [99-102]. Los palangres

se despliegan principalmente en el ámbito oceánico, mientras que las redes de fondo operan en la plataforma continental y la pendiente. Estudios previos han demostrado que una gran parte de las tortugas marinas bobas inmaduras halladas frente a la costa este de la península usaban extensamente la plataforma continental y exhibían una fuerte fidelidad a algunas áreas de alimentación neríticas donde estaban expuestas a capturas incidentales en artes de pesca neríticas [103]. Por lo tanto, la captura incidental por arrastreros de fondo es un problema a considerar en la costa mediterránea española para la conservación de poblaciones de tortugas bobas [91, 102, 103] el área entre Cataluña y la región de Valencia, el Delta del Ebro - provincia de Castellón, tiene la plataforma continental más ancha de la costa mediterránea española, y es un punto de acceso particular de captura accidental de tortugas, donde la pesca de arrastre de fondo es la pesca mayoritaria [102]. Hasta la actualidad se consideraba que las tortugas enredadas en estos tipos de artes de pesca pueden ahogarse y sufrir lesiones graves de tipo constrictivo en sus aletas debido a las líneas o cuerdas. El presente trabajo plantea una relación directa de este tipo de pesca con la fisiopatología de la enfermedad descompresiva en estas especies.

En el caso de los sistemas de arrastre se trata de un sistema por el que las redes son arrastradas y empujadas por los buques para capturar diferentes especies marinas (con fin comercial). Las redes se despliegan a lo largo del fondo marino o en columna en función de la especie que se desea pescar. Estos barcos están equipados con una red en forma de cono con un cuerpo principal formado por un número variable de puertas (normalmente dos o cuatro) que mantienen la red abierta (figura 19). Un mismo barco puede remolcar una red o dos arrastres en paralelos desde la popa o desde los estabilizadores (FAO 2001c). Por lo general el tamaño de la maya de la red disminuye gradualmente desde el vértice más distal.

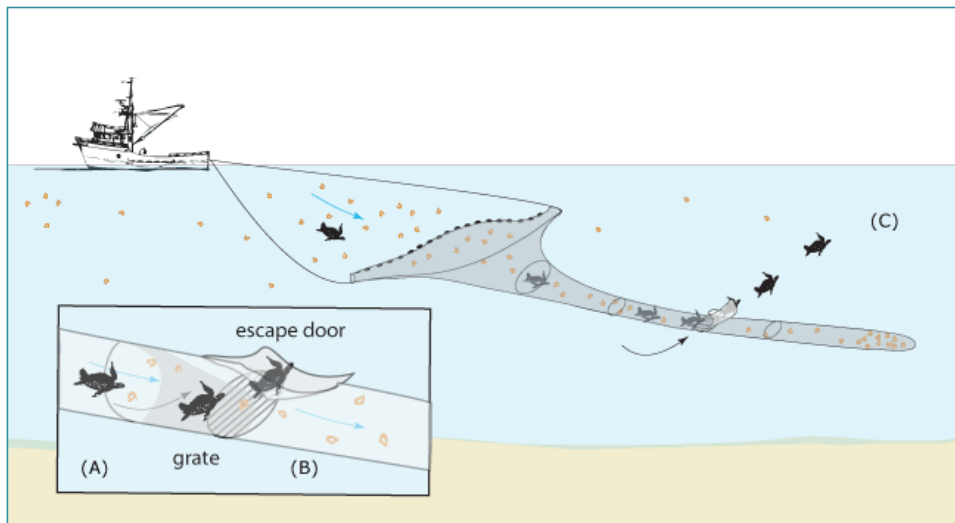


Figura 19: Embarcación de pesca de arrastre.

A pesar de ello existen muchas variaciones entre países e incluso regiones, pero la función es esencialmente igual. Las tortugas marinas normalmente se quedan atrapadas en las redes mientras se alimentan o cuando descansan en el fondo. De esta interacción encontramos patologías consecuentes como ahogamientos, alteraciones fisiológicas por el intento de escaparse y síndrome descompresivo que deriva en muchos casos en muerte. Además, pueden lesionarse o asfixiarse por la compresión que sufren en algunos casos. Estos animales pueden aparecer vivos, muertos o en diferentes estados comatosos al sacarlas de las redes de pesca.

Como con otros sistemas de pesca, la frecuencia de las capturas depende de la intensidad de pesca en la zona y la densidad de animales en esa región. Para estimar este dato se tienen en cuenta diferentes parámetros como la profundidad de la red, temperatura del agua y las recapturas.

Como reseña, en un estudio de campo en el que se examinó la supervivencia de las tortugas marinas capturadas por redes de arrastre se observó una correlación directa entre el tiempo de arrastre y la mortalidad de estos animales. Se han observado además, porcentajes mayores de muerte tras periodos largos de inmersión.

Además de provocar estrés, alteraciones comportamentales y alteraciones fisiológicas que son exacerbadas a medida que se prolonga la inmersión [13, 104-106].

Hasta el presente estudio la principal causa de la muerte era el ahogamiento. Pero el estudio de los mecanismos que previenen a estos animales de sufrir embolia gaseosas, así como la respuesta del esfínter de la arteria pulmonar a diferentes neurotransmisores nos ayudará a entender mejor cómo se desencadena esta patología cuando el animal se enfrenta a un estímulo estresante como es la captura accidental en redes de pesca.

La reducción de las capturas accidentales representa uno de los problemas de conservación de más difícil solución para las especies de megafauna con ciclos biológicos complejos, de vida larga y que necesariamente deben realizar largos viajes para desplazarse de sus áreas de reproducción hasta las áreas de alimentación, y a la inversa [72, 80]. La longitud de sus desplazamientos y su gran longevidad, hacen que incluso un riesgo de captura relativamente bajo pueda tener un efecto acumulado importante sobre estas especies. Además, sus viajes implican territorios con distintas jurisdicciones, por lo que para la aplicación de medidas de gestión adecuadas exige la acción internacional, la cooperación entre países y, en algunos casos, la necesidad de instrumentos políticos a gran escala para hacer frente. Por tanto, el desarrollo de estrategias eficaces de reducción de la captura accidental es un reto ambiental complejo, que incluye componentes científicos, socioculturales y socioeconómicos [82].

Las **estrategias** para reducir la captura accidental se pueden desarrollar de diferentes formas y dependen del tipo de pesca, las características de las especies capturadas, la colaboración de los pescadores y la eficacia de los diferentes organismos gubernamentales. Entre las medidas propuestas destacan los sistemas de exclusión de tortugas marinas (TEDs) y las medidas sensoriales como sistema de exclusión:

- Los sistemas TEDs (figura 20) se desarrollaron durante 1980 en Estados Unidos en colaboración con el servicio Nacional de embarcaciones pesqueras con el fin de reducir la pesca accidental de tortugas marinas. Existen diferentes tamaños y formas de estos dispositivos, pero todos funcionan de forma similar. Se trata de una puerta de escape

situada en el cuello de la red que fuerza a las tortugas a escapar por ella y permitir que el pescado continúe a través del canal hasta el fondo de la red siendo las pérdidas mínimas. Inicialmente el uso de dispositivos TEDs fue obligatorio de forma estacional en todas las embarcaciones de arrastre durante 1987. En 1994 se añadió estos dispositivos a otros sistemas de pesca. A pesar de reducirse el número de interacciones también se observó que el diseño de los dispositivos era muy pequeño para permitir la exclusión de tortugas de la especie *Caretta caretta* y verde [107]. A partir de ahí se establecieron nuevas normas en el diseño de estos dispositivos que comenzaron a emplearse en 2003 [73]. El uso de de TEDs en redes de arrastre en Estados unidos ha reducido de forma muy significativa el número de capturas reportadas [73]. De ello que se esté fomentado el uso de estos dispositivos fuera de Estados unidos, pero requiere no solo de su instalación sino de su correcto seguimiento, verificación de buen funcionamiento, etc.

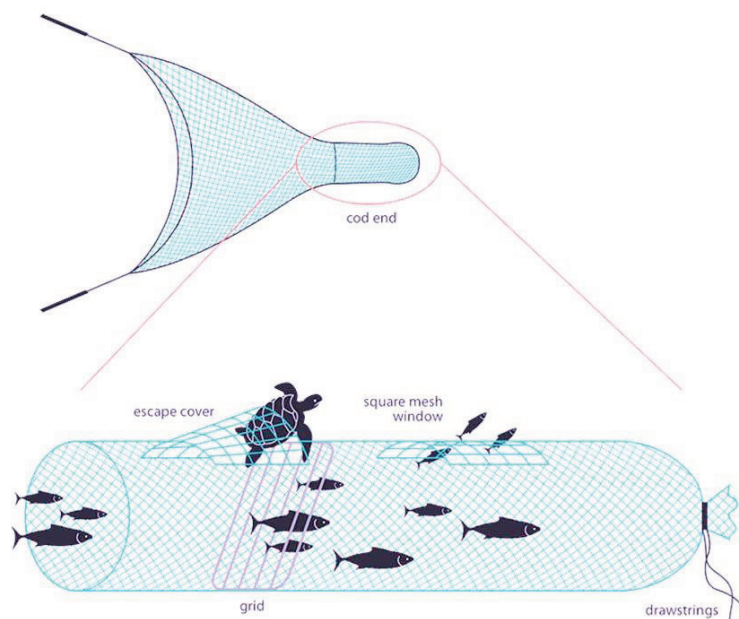


Figura 20: Representación de los sistemas de exclusión de tortugas marinas (TEDs) en redes de arrastre.

- Las medidas sensoriales proponen centrarse en el estudio de las diferencias respecto a la visión entre las tortugas marinas y las especies de peces que se desean capturar [108]. Desafortunadamente estas características coinciden en muchas ocasiones y hasta el momento no se ha descubierto un estímulo particularmente atractivo para los

peces que no afecte a las tortugas marinas. Un ejemplo de ello son los rayos ultravioletas, detectables por las tortugas marinas pero no por algunas especies de peces. En un estudio realizado en Baja California, México, se utilizó este sistema, empleando barcos iluminados y barcos no iluminados. Las redes iluminadas con rayos ultravioletas a través de LEDs capturaron un 40% menos de tortugas pero suponía un efecto dañino en las especies de peces [109]. Estas estrategias necesitan aún un estudio más profundo y detallado hasta encontrar un sistema válido.

- Otra medida propuesta y llevada a cabo es la de establecer periodos de descanso en los que no se pueda pescar, cerrando ciertas áreas en momento determinados de tiempo. Ya que un área cerrada sea mejor que no permitir un sistema de pesca concreto (FAO 2009). Todo ello de acuerdo a los estudios que haya en cada zona que nos ayuden a reconocer las zonas elegidas por estas especies y los momentos. Como hemos hablado anteriormente, en el caso del mediterráneo se ha reportado una mayor interacción en los meses fríos cuando los animales pasan más tiempo en la superficie o están menos activas y con ello es más difícil escapar de las redes [12].

Por un lado, es básico conocer cuáles son las especies y poblaciones afectadas, ya que las características biológicas y su comportamiento determinarán sus patrones de distribución y el uso que hacen del hábitat, haciéndolas más o menos vulnerables a ser capturadas [82]. Por otra parte, también es necesario caracterizar las capturas accidentales en sí mismas, es decir, cuantificar el número total de capturas por cada arte y zona, definir los artes de pesca que tienen una incidencia más elevada, estimar la mortalidad que generan (tanto directa como indirecta) y determinar las consecuencias que conllevan para las poblaciones. Sólo con esta información podremos ser capaces de definir las estrategias necesarias para poder encontrar una solución a cada situación, consiguiendo realizar una gestión adecuada para llegar a un consenso entre la reducción de las capturas y los efectos para los pescadores, y logrando a la larga una pesca sostenible.

En los últimos años se han logrado avances sustanciales en el desarrollo de estrategias de mitigación y gestión para reducir esta captura accidental de grandes vertebrados marinos [70, 86]. De modo que, en muchos casos, se ha llegado a la recuperación de poblaciones colapsadas con la creación de acuerdos nacionales muy eficaces [80]. Sin embargo, en

muchos países todavía no se ha logrado y sigue siendo un problema de actualidad para muchas especies migradoras [71].

Se trata, pues, de especies que presentan un buen ejemplo de la necesidad de plantear **estrategias de conservación** que sean globales [73, 74, 82] para poder recuperar sus poblaciones. Aun así, el hecho de ocupar un territorio tan grande ha causado una gran complicación a la hora de considerar su grado de amenaza, así como su correspondiente estado de conservación entre diferentes regiones. De este modo, a pesar de la necesidad de conseguir éxitos globales de conservación para las poblaciones de tortugas marinas, se ha visto que es necesario actuar localmente, para responder a los impactos específicos de cada región. Por este motivo se han creado las llamadas unidades de gestión regional (RMUs) [73], como respuesta a una necesidad de organizar las tortugas marinas en unidades de protección. Por cada RMU, se han tenido en cuenta una serie de factores como el tamaño de la población, la tendencia poblacional, la vulnerabilidad de las colonias y la diversidad genética, así como las capturas accidentales y otras amenazas que las afectan particularmente. De esta manera se están adaptando las estrategias de gestión a cada caso, ya que por cada RMU pueden variar los artes de pesca de mayor incidencia, las tasas de mortalidad generada, las consecuencias por las diferentes poblaciones y la respuesta de la especie a las medidas de gestión potencialmente más adecuadas.

Hasta la fecha, la mayoría de los esfuerzos para reducir la amenaza a la que se enfrentan se han centrado en la modificación de los artes y la identificación de las áreas que deberían estar cerradas a la pesca, ya que allí las tortugas marinas son muy vulnerables.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2. 1 HIPÓTESIS

En varias especies de animales marinos se han descrito evidencias clínicas compatibles con enfermedad descompresiva, aunque a día de hoy se desconoce el mecanismo por el cual estas especies, adaptadas al buceo, sufren dicha patología. Además muchos estudios reportan la elevada incidencia de tortugas marinas muertas debido a la interacción pesquera pero estos animales no presentaban patologías claras que justificasen la causa de la muerte.

En 2014 se publicó la primera evidencia de síndrome descompresivo en tortugas de la especie *Caretta caretta*. En el estudio se mostraba su sintomatología y su respuesta al tratamiento, pero hasta la actualidad se desconocía el origen de tal enfermedad en estas especies.

Las tortugas marinas presentan reajustes fisiológicos durante el buceo englobados en la conocida como “respuesta al buceo”, pero se desconocen los mecanismos que provocan el fallo en los sistemas que previenen a estos animales frente a la enfermedad descompresiva. A nivel circulatorio presentan características propias: entre ellas destacamos las derivaciones cardíacas y su importancia en la redistribución de la sangre durante el buceo y estructuras únicas vasculares como el esfínter de la arteria pulmonar derecha e izquierda. Muy pocos estudios hacen referencia al esfínter que presenta la arteria pulmonar en algunas especies de reptiles y su función. La presente tesis doctoral plantea que se trata de una modificación anatómica que ayuda a limitar el intercambio de gases durante el buceo y que frente a un estímulo estresante, como es la captura accidental en redes de pesca, este mecanismo falla.

Basándonos en los antecedentes anteriormente descritos es razonable hipotetizar que el esfínter de la arteria pulmonar puede jugar un papel muy importante en la etiología de esta enfermedad.

## 2.2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar la funcionalidad del esfínter de la arteria pulmonar y su implicación en la enfermedad.

Con el fin de evaluar la validez de la hipótesis planteada, se establecen los siguientes subobjetivos:

- (1) Conocer mejor la anatomía e histología de esta nueva estructura localizada en la arteria pulmonar de las tortugas marinas.
- (2) Estudiar su fisiología y respuesta frente a los principales neurotransmisores descritos.
- (3) Estudiar también la fisiología del resto de tejidos y estructuras anatómicas que participan durante la respuesta al buceo como es el parénquima pulmonar, la arteria pulmonar, las arterias intrapulmonares o las arterias sistémicas, con el fin de entender el funcionamiento global del sistema cardiorrespiratorio de estas especies.
- (4) Estudiar la posible relación entre el estrés inducido por la captura accidental de estas especies en redes de pesca y el desarrollo de una enfermedad de tipo descompresivo.
- (5) Estudiar la respuesta en animales neonatos de *Caretta caretta* con el fin de comparar la funcionalidad de este esfínter en las diferentes etapas de la vida de estas especies, puesto que sus patrones de buceo son distintos.
- (6) Estudiar la respuesta de los tejidos en tortugas de agua dulce, de la especie *Trachemys scripta*, que no presentan esfínter en la arteria pulmonar.

### **3. METODOLOGÍA**



## 3.1 MATERIALES

### 3.1.1 Obtención del preparado

Se han utilizado preparados de arteria pulmonar de *Caretta caretta* y *Trachemys scripta* así como parénquima pulmonar de ambas especies. En ellos, y en función del tejido disponible, se han realizado diferentes estudios: estudios de funcionalidad por medio del baño de órganos, histología, inmunohistoquímica y western blot.

El tejido se obtuvo de 3 tipos de animales:

Para los estudios de funcionalidad en tortuga marina adulta o subadulta los tejidos se obtuvieron de 5 tortugas bobas (*Caretta caretta*) procedentes del centro de recuperación Arca del Mar del Oceanográfico de Valencia con el permiso de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural. Todos los tejidos proceden de animales que murieron a su llegada al centro o que fueron eutanasiados bajo supervisión y decisión veterinaria. Ningún animal fue eutanasiado con el fin del presente trabajo. La exploración de los animales del estudio no reveló ninguna alteración cardiovascular o respiratoria que suponga una interferencia en el estudio. Los datos de estos animales se recogen en la tabla 3.

Identificación	LCC (cm)	ACC (cm)	Arte de pesca	Peso (Kg)	Sexo
CC 210	53	51	Trasmallo	19.2	Hembra
CC 212	35.7	32.5	Trasmallo	5.9	Hembra
CC 13.4.15	34.8	30.5	Trasmallo	4.8	Macho
CC 29.3.15	27	24	Varado	2.6	Hembra
CC 225	66.5	51	Arrastre	19.5	Hembra

Tabla 3: CC= *Caretta caretta*; LCC= longitud del caparazón en curvo (cm); ACC= Ancho del caparazón en curvo (cm).

Para los estudios de funcionalidad en tortugas marinas neonatas se emplearon los tejidos de 8 tortugas bobas (*Caretta caretta*) procedentes del centro de recuperación Arca del Mar del Oceanografic de Valencia. Todos los tejidos proceden de animales que murieron a su llegada al centro o que fueron eutanasiados bajo supervisión y decisión veterinaria. Los datos de estos animales se recogen en la tabla 4.

Identificación	Peso (Kg)
CC1	0,413
CC5	0,265
CC7	0,426
CC10	0,284
CC23	0,411
CC52	0,405
CC71	0,226
CC100	0,219

Tabla 4: CC= *Caretta caretta*; LCC= longitud del caparazón en curvo (cm); ACC= Ancho del caparazón en curvo (cm).

Para los estudios de funcionalidad en tortugas de agua dulce (*Trachemys scripta*) los tejidos se obtuvieron de 6 animales del centro de recuperación de fauna “la granja” en el Saler, Valencia. Estos animales fueron eutanasiados como parte del programa de erradicación gestionado por la Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural.



### **3.1.2 Almacenamiento y viabilidad del preparado**

El preparado se puede emplear “en fresco” para realizar el experimento dentro de las primeras 48 horas, después de la extracción se mantiene en solución DMEM (Lonza Ref. BE12-614F). El medio de cultivo DMEM es un líquido diseñado para mantener estables y vivos los tejidos ya que contiene una fuente apropiada de energía y compuestos que regulan el ciclo celular. Está compuesto de un complemento de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, y suero como fuente de factores de crecimiento, hormonas y factores de adhesión. Además de nutrientes, el medio también colabora en mantener el pH y la osmolaridad.

### **3.1.3 Almacenamiento del tejido arterial y pulmonar mediante criopreservación.**

Las muestras empleadas para la realización de Western Blot fueron exclusivamente de tortugas marinas adultas o subadultas debido a la disponibilidad de tejidos y se almacenaron bajo criopreservación. Se han descrito diferentes métodos de congelación y de agentes crioprotectores para el almacenamiento de tejidos aislados para su posterior empleo en estudios experimentales farmacológicos [110-114].

Los tejidos disponibles fueron: arteria pulmonar y parénquima pulmonar de tortuga marina adulta o subadulto. Los diferentes tejidos, antes de que transcurran más de dos horas desde su extracción de la pieza total, se introducen en unas ampollas de almacenamiento en nitrógeno líquido (NuncCryo Tubes TM) de 1,8 ml (volumen de trabajo) que contienen suero bovino fetal y dimetil sulfóxido o DMSO (1,8 M) como agente crioprotector que se encarga de mantener las propiedades mecánicas (contracción-relajación) y bioquímicas del músculo liso vascular pulmonar.

Introducimos en el suero las arterias sin cortar en anillos, prestando especial atención a que el suero penetre en la luz de los vasos y cubra totalmente los vasos. Después de un periodo de estabilización de 60 minutos a 4º C, las ampollas se introducen en un contenedor cilíndrico de criocongelación (1 x 14 cm; Nalgene TM) donde se congelarán las muestras vasculares lenta y progresivamente, con una media de -1º C por minuto, hasta -80º C. Después de transcurridas entre 4 y 12 horas se pueden transferir a nitrógeno líquido a -196º C donde se pueden almacenar hasta su uso. Antes de su empleo, el proceso de descongelación también deberá de ser progresivo, y para ello las ampollas con los preparados se expondrán a una temperatura de -80º C durante 10-20 minutos y posteriormente se introducirán en un baño de agua a 37º C para que se descongelen durante unos 2,5 minutos. Una vez descongelados los preparados se lavarán en un recipiente que contenga Krebs-Henseleit a temperatura ambiente y se podrán emplear para experimentos “in vitro”.

### 3.1.4 Reactivos utilizados

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Acetilcolina	Sigma	Ref. A6625
Ácido acético glacial	Panreac	Ref. 361008
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	Ref. 131020
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Ref. A3574
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Applied Biosystems	Ref. AM9906
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Ref. A7906
Amonio persulfato	Sigma-Aldrich	Ref. A3678
Bicarbonato sódico (NaHCO <sub>3</sub> )	E. Merck Darmstadt	Ref. 106392
Bifosfato potásico (K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	E. Merck Darmstadt.	Ref. 109477
Cloruro de calcio (Ca Cl <sub>2</sub> )	E. Merck Darmstadt	Ref. 102382
Cloruro de magnesio (Cl <sub>2</sub> Mg)	Panreac	Ref. 141396
Cloruro de potasio (KCl)	E. Meckr Darmstadt.	Ref. 104818
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac	Ref.141659
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	P8340
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Scientific	Ref. 1856210
Dimetilsulfóxido (DMSO)	E. Meckr Darmstadt	Ref. 34869

<b>DMEM</b>	Lonza	Ref. BE12-614F
<b>Dodecilsulfato sódico (SDS)</b>	Sigma-Aldrich	Ref. L3771
<b>DPX</b>	Panreac	Ref. 255254
<b>ECL plus</b>	Amersham GE Healthcare	Ref. RPN2132
<b>EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)</b>	Sigma	Ref. ED2SC
<b>EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)</b>	Sigma	Ref. E3889
<b>Eosina amarillenta</b>	Panreac	Ref. 251299
<b>Epinefrina</b>	Sigma	Ref. E7386
<b>Etanol absoluto</b>	Panreac	Ref. 361086
<b>Formol 10%</b>	Panreac	Ref. 143091
<b>Glicerol</b>	Sigma-Aldrich	Ref. G5516
<b>Hematoxilina</b>	Sigma-Aldrich	Ref. GHS332
<b>Hematoxilina de Ehrlich</b>	Sigma-Aldrich	Ref. GHS322
<b>Hematoxilina de Harris</b>	Panreac	Ref. 253949
<b>HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1piperazino etanosulfónico)</b>	Sigma-Aldrich	Ref. H4034
<b>Hidróxido sódico (NaOH)</b>	Panreac	Ref. 131687
<b>Histamina</b>	Sigma	Ref. H7125
<b>Isopropanol</b>	Sigma	Ref. I9516
<b>Kit BCA para cuantificación de proteínas</b>	Pierce	Ref. 23227
<b>Kit BCA Protein Assay</b>	Thermo Scientific	Ref. 23225
<b>Kit de tinción panóptica</b>	Panreac	Ref. 254807.0922
<b>Metanol</b>	Sharlab	Ref. ME03262500
<b>Methocel Colorcon ID34538P Nonidet P 40</b>	Sigma	Ref. 74385
<b>Papaverina</b>	Sigma	Ref. P3510
<b>Parafina</b>	Sigma-Aldrich	Ref.P3683
<b>Paraformaldehído 4%</b>	Panreac	Ref.252931
<b>Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)</b>	Sigma	Ref. P7626
<b>Polietilenglicol 400</b>	Panreac	Ref. 162436
<b>Ponceau de xilidina</b>	Merk	Ref. 1159270025
<b>Serotonina (5HT)</b>	Sigma-Aldrich	H9523
<b>Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>)</b>	E.Merck Darmstadt	
<b>Tampón salino fosfato (PBS)</b>	Sigma-Aldrich	Ref.P4417
<b>Tampón krebs Henseleit</b>	Sigma-Aldrich	Ref. K3753
<b>Tetramethylethylenediamine para electroforesis (TEMED)</b>	Sigma-Aldrich	Ref.T9281
<b>Triton X-100</b>	Panreac	Ref. 142314
<b>Trizol</b>	Roche Diagnostics	Ref.1667157001
<b>Tween20</b>	Sigma-Aldrich	Ref.P1379

Xileno	Merck	Ref. 481769
$\beta$ -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	Ref. M6250

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Baño de órganos

El sistema de baño de órganos empleado está formado por una doble copa de vidrio que consta de:

- Una cámara externa, parte de un circuito cerrado, que mantiene constante la temperatura de la cámara interna mediante una rápida circulación de agua a 37° C de temperatura utilizando un termocirculador (Thermocirculator Harvard).

- Una cámara interna de 5 ml de capacidad donde se coloca la solución nutritiva de Krebs-Henseleit que estará continuamente burbujeada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) a través de un filtro poroso conectado en el fondo de la cámara. En el fondo de la cámara también hay un dispositivo de entrada y otro de salida para el aporte y drenaje, respectivamente, del líquido nutritivo. La cámara interna en su interior aloja una varilla de acero inoxidable acodada y rematada en una varilla, donde se introduce el anillo vascular pulmonar.

Todo el sistema está sujeto a la mesa de laboratorio, mediante un emparrillado vertical reforzado, quedando así aislado de las vibraciones y golpes en el suelo o en la misma mesa donde están colocados los aparatos de registro, debido a la extrema sensibilidad necesaria para el registro de las contracciones del preparado.

Las copas de vidrio del baño, las varillas de sujeción y el transductor isométrico están sujetas mediante pinzas y nueces al emparrillado (figura 21). Habitualmente, en cada experimento, se trabaja con 8 copas de baño de órganos diferentes.

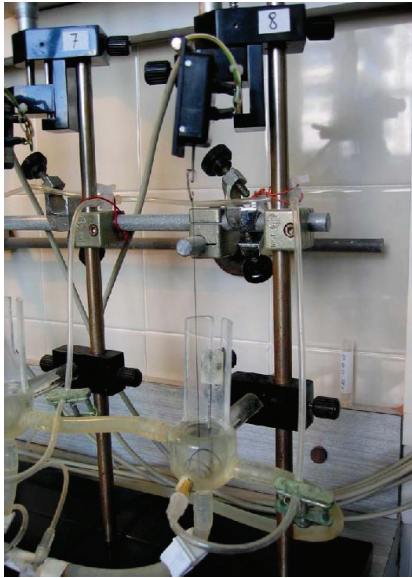


Figura 21: Detalle de la copa del baño de órganos.

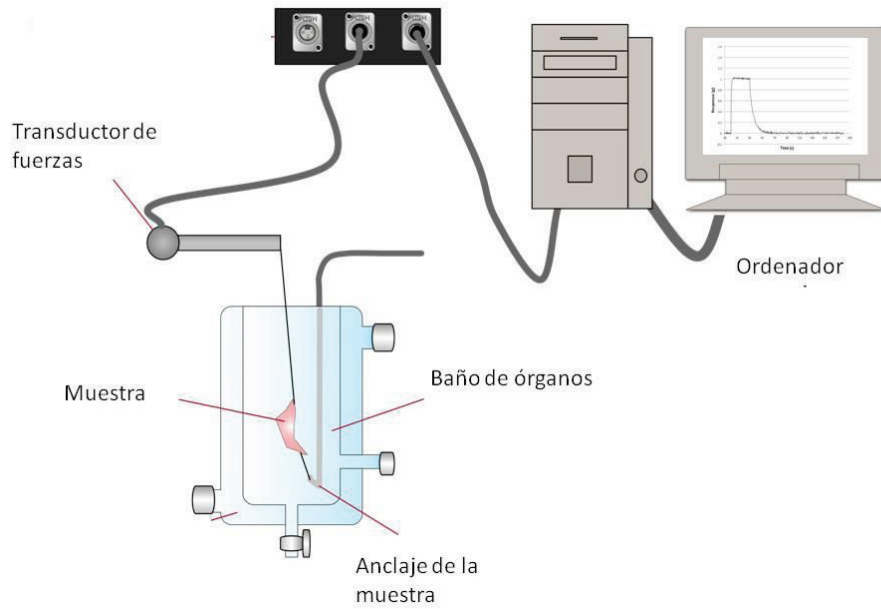


Figura 22: Esquema general del baño de órganos

### **3.2.1.1 Montaje del preparado arterial y pulmonar**

Los preparados se limpian bien y se procede a cortar anillos de 3-4 mm de longitud, desechando los anillos cortados de los bordes del vaso, ya que suelen estar más deteriorados que el resto del vaso. En nuestro estudio disponemos de dos tipos diferentes de preparados: el tejido vascular y el parénquima pulmonar.

#### **3.2.1.1.1 Preparado arterial:**

El preparado arterial se introduce en la cámara interna de la copa del baño que está llena de solución nutritiva de Krebs- Henseleit a temperatura ambiente y saturada con carbógeno. A lo largo del experimento, se toman muestras del líquido nutritivo para medir el pH y comprobar que se mantiene dentro de los límites razonables (no debe exceder 7,6 al final del experimento). Los anillos vasculares se colocan con dos finas varillas en su interior. La primera forma parte de la varilla de acero inoxidable acodada que se introduce en el baño, supone un punto fijo en el interior del baño, y sujetará el anillo por su parte inferior. La segunda varilla une el preparado pulmonar a un transductor isométrico model Grass FT-03 (Grass Instruments, Quincy, MA), provisto de un tornillo micrométrico de precisión que permite transmitir pequeños cambios de tensión del tejido. El transductor isométrico, a su vez, está conectado a un amplificador PowerLab 800 (AD Instruments, Grand Junction, CO) provisto de un mecanismo de supresión cero y señal interna de calibración. Los cambios en la tensión isométrica de los anillos vasculares son procesados en el amplificador y se registran en un ordenador que utiliza el programa Chart for Windows versión 3.4 (ADInstruments) que permite obtener un registro gráfico para análisis posterior. Los cambios en fuerza se expresan en gramos.

La tensión inicial o basal de contracción impuesta al preparado fue de 1,5 a 2 gramos y el tiempo de estabilización o equilibrado de 60 minutos, durante los cuales, cada 10 - 15 minutos, se realizan lavados o cambios periódicos de la solución nutritiva de Krebs Henseleit.



Figura 23: Amplificador PowerLab 800



Figura 24: Termocirculador



Figura 25: Sistema de Baño de órganos.

#### 3.2.1.1.2 Preparado pulmonar:

El preparado pulmonar se introduce en la cámara interna de la copa del baño que está llena de solución nutriticia de Krebs- Henseleit a temperatura ambiente y saturada con carbógeno.

A lo largo del experimento, se toman muestras del líquido nutritivo para medir el pH y comprobar que se mantiene dentro de los límites razonables (no debe exceder 7,6 al final del experimento).

Las muestras de tejido pulmonar se obtienen directamente de los pulmones cortando tiras de parénquima. En nuestro estudio se han obtenido muestras de tortuga marina adulta y subadulta, tortuga marina neonata y tortuga de agua dulce. Para ello el pulmón se sitúa sobre una placa de Petri y sumergido en solución nutritiva de Krebs- Henselet y se corta con bisturí en tiras de 5mm x 5mm x 10mm. Esas tiras de parénquima contienen vasos y vías aéreas periféricas de pequeño tamaño. A continuación, las tiras de parénquima se colocan anudadas a las dos finas varillas que están en el interior de cada copa. Estas varillas son las mismas que las descritas para el protocolo en tejido vascular y el sistema de medición es el mismo. Asimismo, a tensión inicial o basal de contracción impuesta al preparado fue de 1,5 a 2 gramos y el tiempo de estabilización o equilibrado de 60 minutos, durante los cuales, cada 10 - 15 minutos, se realizan lavados o cambios periódicos de la solución nutritiva de Krebs-Henselet.

La composición de la solución nutritiva Krebs- Henselet empleada fue la siguiente:

*	* NaCl	118,4 mmol
*	* KCL	4,7 mmol
*	* CaCl <sub>2</sub>	2,5 mmol
*	* MgSO <sub>4</sub>	0,6 mmol
*	* K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mmol
*	* CO <sub>3</sub> HNa	25,0 mmol
*	* D(+)-Glucosa	11,1 mmol

Agua destilada c.s.p. 1000ml, pH 7,4 – 7,6.

### 3.2.1.2 Preparación de los fármacos

Las soluciones de todos los fármacos se prepararon de modo extemporáneo disolviéndolos a temperatura ambiente en agua desionizada, en solución salina fisiológica o solución de Krebs-Henselet.



Los fármacos empleados se añaden al baño, dependiendo del grupo de experimentos, bien en concentraciones aditivas crecientes, siguiendo la técnica acumulativa de Van Rossum o bien en concentraciones únicas. Las concentraciones de los diferentes fármacos empleados se expresan en términos de concentraciones molares (M).

### **3.2.1.3 Protocolo experimental**

Del tejido disponible de todos los animales se diseccionaron las siguientes estructuras:

1. Ambas arterias pulmonares desde su salida del corazón hasta su llegada al hilio pulmonar, diferenciando en este tramo dos regiones. Los dos tercios proximales al pulmón de esta arteria presenta un esfínter muscular que es posible diferenciar macroscópicamente, nos referiremos a esta región como esfínter de la arteria pulmonar. El resto de región libre de esfínter lo consideraremos como arteria pulmonar. En el caso de la tortuga de agua dulce no existe esta estructura definida como esfínter, por lo que en todo el estudio hablaremos de arteria pulmonar exclusivamente.
2. El tramo de arteria pulmonar que discurre a través de los pulmones y que en el estudio citaremos como arteria intrapulmonar. Este tejido solo ha podido ser diseccionado (por una cuestión de tamaño principalmente) en tortugas marinas adultas o subadultas.
3. Preparados de tejido pulmonar, cuya respuesta en el baño de órganos es representativa de las vías aéreas y del tejido vascular distal.
4. En el caso de las tortugas marinas adultas o subadultas también fue posible incluir en el estudio muestras de una de sus arterias sistémicas: arteria aorta derecha.

Todos los tejidos eran macroscópicamente normales. Éstos fueron cuidadosamente diseccionados estando libres de tejido conectivo adyacente y parénquima pulmonar (en el caso de las arterias). En el caso del parénquima pulmonar se diseccionaron fragmentos de 5mm x 5mm x 10mm de tejido macroscópicamente normal y libre de tejido adyacente.

#### **3.2.1.3.1 Diseño de los estudios farmacomecánicos en anillos arteriales:**

Después del aclarado y estabilización de los preparados se llevaron a cabo dos tipos distintos de curvas dosis - respuesta. Cada uno de los tipos de estas curvas fue realizado en todos los animales del estudio.

- **Curvas de contracción acumulativas:** Después del periodo de estabilización y obtención de una línea basal, comenzamos a añadir al baño concentraciones crecientes del neurotransmisor (de  $10^{-9}$ M a  $10^{-3}$ M) recogiendo los valores de tensión isométrica para cada una de estas dosis. Estas concentraciones sucesivas fueron añadidas solo cuando la preparación alcanzó valores estables de contracción arterial. En el caso de tortugas marinas este protocolo fue empleado para serotonina (5-HT) y acetilcolina (Ach) en todos los tejidos vasculares (arteria pulmonar, esfínter de la arteria pulmonar y arteria intrapulmonar). En el caso de la arteria intrapulmonar también se empleó este protocolo para valorar la respuesta frente a adrenalina.

En el caso de las tortugas de agua dulce este protocolo fue empleado en arteria pulmonar para estudiar su respuesta frente a serotonina, acetilcolina y adrenalina.

- **Curvas de relajación:** Para estudiar el efecto de la adrenalina sobre la arteria pulmonar y el esfínter de la arteria pulmonar en tortugas marinas los tejidos fueron previamente contraídos con 5-HT, se añadió en primer lugar tras el aclarado y estabilización una dosis de 5-HT  $10\mu$ M, para así generar una meseta de contracción. Una vez estabilizado el valor de contracción arterial, comenzaron a adicionarse dosis crecientes de adrenalina (de  $10^{-9}$ M a  $10^{-3}$ M) siendo añadidas estas concentraciones sucesivas sólo cuando el tejido alcanzó

un efecto estable. Finalmente se añadió una dosis de Papaverina 0,3 mM para alcanzar así el máximo valor de relajación.

### **3.2.1.3.2 Diseño de los estudios farmacomecánicos en parénquima pulmonar:**

Los preparados de parénquima pulmonar fueron montados en una cámara de baño de órganos de 10 ml (Pan-Lab, EEUU) bajo una carga inicial de 1 g, y la tensión isométrica fue recogida con un transductor de fuerza isométrica (Ref. FT03; Grass Instruments, Quincy, MA, EEUU) conectado a un sistema de adquisición de datos PowerLab® (AD Instruments, Castle Hill, Nueva Gales del Sur, Australia). Los tejidos se estabilizaron en tampón Krebs-Henseleit durante 90 minutos a temperatura ambiente, mientras eran aireados con 5% de CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>. A continuación fueron realizados tres lavados de los preparados con tampón Krebs-Henseleit, realizándose dichos lavados cada 5 minutos. Después del aclarado y estabilización, se llevó a cabo un tipo de curva dosis - respuesta.

- **Curvas de contracción:** Después del periodo de estabilización comenzamos a añadir al baño concentraciones crecientes del neurotransmisor (de 10<sup>-9</sup>M a 10<sup>-3</sup>M), recogiendo los valores de tensión isométrica para cada una de estas dosis. Estas concentraciones sucesivas fueron añadidas solo cuando la preparación alcanzó valores estables de contracción arterial. Este protocolo fue empleado para acetilcolina (Ach), adrenalina, histamina y serotonina (5HT)

### **3.2.1.4 Valoración de los resultados**

#### **3.2.1.4.1 Análisis de las curvas concentración-respuesta:**

Para elaborar las curvas concentración-respuesta de cada fármaco se utiliza el programa informático (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

En las curvas de contracción hemos estudiado:

- La respuesta o efecto máximo (Emáx): A lo largo de todo el trabajo el Emáx se ha expresado en gramos de fuerza.

- Potencia del fármaco: mediante el estudio de la concentración molar requerida para producir el 50% del efecto máximo (CE50). Se calcula mediante una regresión no lineal individual de cada curva concentración-respuesta, mediante el programa GraphPad, y la expresamos como  $pD_2$  ( $pD_{50} = -\log CE50$ ).

En las curvas de relajación hemos estudiado:

- La respuesta o efecto máximo (Emáx): se expresa tomando el valor de relajación máximo producido por la papaverina. En este caso los resultados se han expresado en porcentaje de relajación respecto al efecto máximo producido por la papaverina.
- Potencia del fármaco: igual que en las curvas de contracción.

#### 3.2.1.4.2 Análisis estadístico

Para cada grupo de experiencias se calcularon los parámetros característicos de una distribución: media aritmética, desviación estándar (s.d.) y error estándar de la media (s.e.m.). Todos los valores numéricos se han expresado como media  $\pm$  s.e.m. (error estándar de la media) para un número "n" de experiencias de arterias y venas pulmonares humanas procedentes de diferentes pacientes.

Para la comparación de Emáx (expresado en gramos de fuerza) y  $pD_2$  se empleó el test de la "t" de Student, para muestras no apareadas.

Para la comparación de curvas concentración-respuesta completas se realizó el análisis de la varianza (ANOVA doble vía). Cuando el ANOVA dió diferencias significativas se utilizó como post-test la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, comparando en este caso las diferencias estadísticas punto a punto, es decir, comprobando si las diferencias entre los efectos conseguidos con una misma concentración de noradrenalina difieren entre la curva control y las curvas tratadas.

En aquellos casos en que se ha comparado porcentajes se han utilizado pruebas estadísticas no paramétricas como el test de Mann-Whitney.

Para la aplicación de estos análisis estadísticos se empleó el programa informático Graphpad versión 4.0 (Graphpad Software, San Diego, California).

En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de un valor de la  $p < 0.05$ .

Gráficamente utilizamos las siguientes convenciones:

\* =  $p < 0.05$

\*\* =  $p < 0.01$

\*\*\* =  $p < 0.001$

### **3.2.2 Histología**

#### **3.2.2.1 Obtención de tejido arterial y pulmonar**

El tejido se obtuvo solo de tortugas marinas adultas o subadultas (cinco ejemplares de *Caretta caretta*) procedentes del centro de recuperación Arca del Mar del Oceanográfico de Valencia. Estos tejidos pertenecen a los mismos animales cuyo tejido empleamos en las pruebas de funcionalidad. El tejido de la arteria pulmonar, del esfínter de la arteria pulmonar y del parénquima pulmonar es limitado, por lo que las muestras de tortuga boba neonata y tortuga de agua dulce (*Trachemys scripta*) se emplearon en su totalidad para los estudios de funcionalidad en baño de órganos. A partir de la muestra (de tortugas marinas adultas o subadultas) fijada con formaldehído e incluida en parafina se obtuvieron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de grosor con un microtomo tipo Minot (Leica® RM 2135). Los cortes obtenidos se emplearon para:

- Tinción hematoxilina-eosina y Masson.

- Inmunohistoquímica

#### **3.2.2.2 Tinción con hematoxilina eosina y Masson**

La arteria pulmonar, el esfínter de la arteria pulmonar y el parénquima pulmonar se fijaron con paraformaldehído 4% durante al menos 48 horas. Posteriormente se deshidrató mediante el siguiente procedimiento:

Paso	Solución:	Tiempo (minutos):
1	Etanol 70%	30
2	Etanol 96% I	30
3	Etanol 96% II	30
4	Etanol 100% I	30
5	Etanol 100% II	30
6	Xileno I	30
7	Xileno II	30
8	Parafina I	60

A continuación, se procedió a la inclusión en bloques de parafina con un inclusor EC350-1 Myr (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza). A partir de los bloques obtenidos, se cortaron secciones (4-6  $\mu\text{m}$  de espesor) con un micrótopo HM 340 E (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza) y se adhirieron a portaobjetos. Para realizar la tinción con hematoxilina-eosina, se desparafinaron los cortes con xileno, se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El mismo proceso se realizó con la tinción de Masson. Tras la tinción se deshidrataron las muestras mediante una sucesión de alcoholes crecientes y xileno y se montaron los portaobjetos con el medio de montaje DPX y con cubreobjetos. Se tomaron fotografías de las preparaciones obtenidas con un microscopio de luz visible (x200; Leica DM6000B).

### 3.2.2.2 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico de los diferentes tejidos (parénquima pulmonar, arteria pulmonar, esfínter de la arteria pulmonar y arterias intrapulmonares), en primer lugar el tejido obtenido fue fijado con paraformaldehído al 4% durante 48 horas y a temperatura ambiente, y posteriormente embebido en parafina. Una vez parafinado, el tejido fue cortado en secciones de 4-6  $\mu\text{m}$  con un microtopo (Ref. RM2235; Leica Biosystems, Heidelberg, Alemania) empleando cuchillas descartables, y los cortes fueron recogidos en portas con carga positiva permanente.

Estas secciones fueron desparafinadas e hidratadas en gradiente de alcoholes. Para la recuperación antigénica se empleó una solución de citrato 10mM y pH 6 en agua hirviendo durante 10 minutos. Tras 1 hora de bloqueo con 5% SFB/PBS (tampón salino fosfatado), las secciones se incubaron durante 24h a 4°C con el anticuerpo primario en cuestión diluido con 0,1% de BSA (seroalbúmina bovina) /PBS en la proporción correspondiente. Los

anticuerpos primarios empleados fueron rabbit anti- ADRA1A Polyclonal Antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. bs-0600R, Bioss), Beta-1 adrenergic R/ADRB1 antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. NBP1-59007, Novus Biologicals), alpha-2b adrenergic R/ADRA2B antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. NBP1-55578-0.1mg, Novus Biologicals) beta2 adrenergic R/ADRB2 antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. NBP2-15564, Novus Biologicals), mAChR M1 (H-120) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9106, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mAChR M2 (H-170) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9107, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mAChR M3 (H-210) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9108, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mAChR M4 (H-175) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9109, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mAChR M5 (H-197) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9110, Santa Cruz Biotechnology, inc.). Para el revelado de la inmunotinción se empleó un sistema de revelado basado en polímeros (Kit MasVision Universal, Master Diagnóstica).

Los cortes inmunomarcados fueron observados mediante el microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TE200.

### **3.2.3 Estudio de la expresión proteica: western blot**

#### **3.2.3.1 Obtención de tejido arterial y pulmonar**

El tejido se obtuvo solo de tortugas marinas adultas o subadultas (cinco ejemplares de *Caretta caretta*) procedentes del centro de recuperación Arca del Mar del Oceanográfico de Valencia. Estos tejidos pertenecen a los mismos animales cuyo tejido empleamos en las pruebas de funcionalidad. El tejido de la arteria pulmonar y del esfínter de la arteria pulmonar es limitado, por lo que las muestras de tortuga boba neonata y tortuga de agua dulce (*Trachemys scripta*) se emplearon en su totalidad para los estudios de funcionalidad en baño de órganos.

#### **3.2.3.2 Procedimiento**

La técnica de Western blot fue utilizada para detectar las siguientes proteínas: receptores adrenérgicos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) y los receptores muscarínicos M1, M2, M3. Los tejidos estudiados fueron: el esfínter de la arteria pulmonar, la arteria intrapulmonar y el

parénquima pulmonar procedente de ejemplares de *Caretta caretta* adulta. También empleamos muestras de arteria pulmonar y parénquima pulmonar humano

Para ello los tejidos empleados fueron homogeneizados mediante agitación con el *TissueLyser* (Ref. 85300, Qiagen, Limburgo, Países Bajos) en presencia de un tampón de extracción conteniendo 1 ml HEPES 1M, 5 ml NaCl 4M, 100µl EDTA 0,5M, 500µl EGTA 0,1M, 12,6 ml Glicerol 99,5% y 30,8 ml H<sub>2</sub>O MilliQ; inhibidor de proteasas y PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo). Posteriormente se llevó a cabo la lisis celular tras sucesivos ciclos de choque térmico y tratamiento con el detergente NP40 al 10% durante 15 minutos en hielo. Finalmente, el ensayo Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, Reino Unido) se realizó para cuantificar el nivel de proteína en cada muestra y de este modo poder cargar en el gel de electroforesis la misma cantidad de proteína para todas las muestras.

La electroforesis en gel de sodio-dodecil-sulfato poliacrilamida se usó para separar las proteínas según su peso molecular. Para ello, en dicho gel se cargaron 15 µg de proteína así como un marcador de peso molecular *Bio-Rad Kaleidoscope marker* (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, Reino Unido), ambos previamente desnaturalizados mediante choque térmico de 95°C durante 10 minutos. El gel de poliacrilamida consistió en un *stacking* gel al 5% de acrilamida sobre un gel de resolución al 10%, al que se le aplicó una corriente de 100 V durante 1 hora. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante transferencia húmeda. La membrana se bloqueó durante dos horas con la solución de bloqueo 5% BSA en PBS 0.1% Tween20 y posteriormente se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios (1:1000). Los anticuerpos primarios utilizados fueron rabbit anti- ADRA1A Polyclonal Antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. bs-0600R, Bioss), Beta-1 adrenergic R/ADRB1 antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. NBP1-59007, Novus Biologicals), alpha-2b adrenergic R/ADRA2B antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. NBP1-55578-0.1mg, Novus Biologicals) beta2 adrenergic R/ADRB2 antibody (1:100) (anticuerpo policlonal ref. NBP2-15564, Novus Biologicals), mAChR M1 (H-120) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9106, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mAChR M2 (H-170) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9107, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mAChR M3 (H-210) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9108, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mAChR M4 (H-175) (1:100)



(anticuerpo policlonal ref. sc-9109, Santa Cruz Biotechnology, inc.), mACHR M5 (H-197) (1:100) (anticuerpo policlonal ref. sc-9110, Santa Cruz Biotechnology, inc.). Las proteínas marcadas se detectaron a partir de la emisión de quimioluminiscencia que tiene lugar como consecuencia de la reacción del sustrato del kit ECL plus (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) con los anticuerpos secundarios (1:1000) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Los anticuerpos secundarios empleados en este caso fueron *donkey anti-mouse* (ThermoFisher Scientific, Rockford, EEUU), *donkey anti-rabbit* (ThermoFisher Scientific, Rockford, EEUU). Se empleó  $\beta$ - actina como control interno.

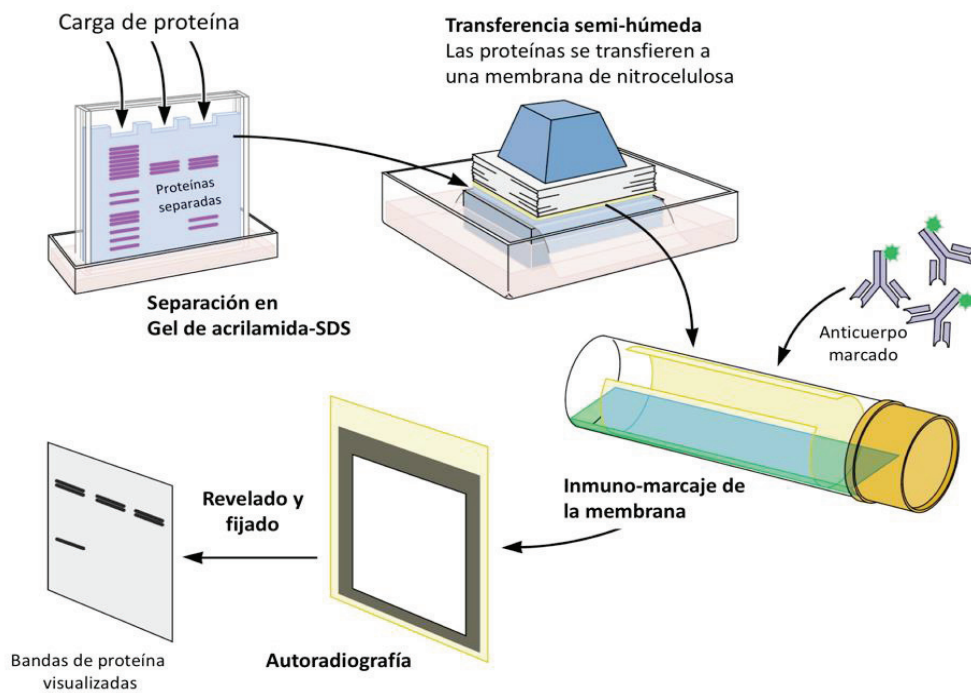


Figura 26: Esquema de la técnica de Western Blotting.

### 3.2.3.2 Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como la media  $\pm$  s.e.m. (error estándar de la media) de los n experimentos. El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo por análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test de Bonferroni cuando se compararon más de 2 grupos. En el caso de comparar diferencias entre dos grupos se utilizó el análisis  $t$  - student (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU.). La significancia fue aceptada cuando  $p < 0,05$

## **4. RESULTADOS**



## 4.1 RESULTADOS OBTENIDOS EN TORTUGAS MARINAS ADULTAS O SUBADULTAS (*Caretta caretta*):

No se han observado diferencias significativas entre los ejemplares estudiados, ni por peso, ni por sexo, ni por tamaño. Así como tampoco por la causa de ingreso en el centro de recuperación.

### 4.1.1 Estudios funcionales:

#### 4.1.1.1 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria pulmonar:

##### 4.1.1.1.1 Efecto de la serotonina:

En la arteria pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $2,72 \pm 0,48$  y  $pD_2$  de  $6,046 \pm 0,32$   $n = 6$  (tabla 5) .Su curva de contracción está representada en la figura 27.

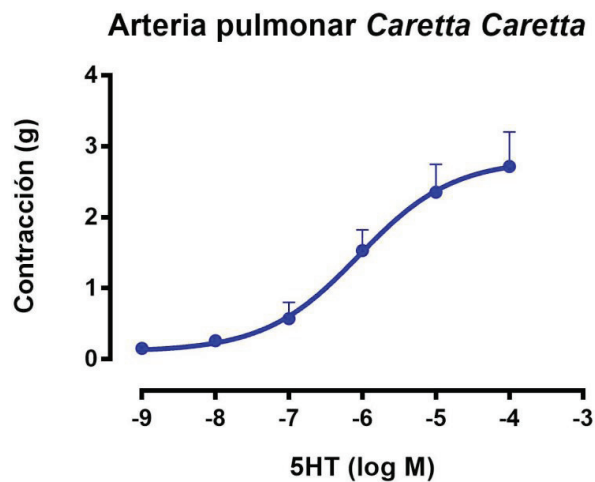


Figura 27: Curva dosis respuesta de la arteria pulmonar (AP) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a serotonina (5HT).

#### 4.1.1.1.2 Efecto de la acetilcolina:

En la arteria pulmonar la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,82 \pm 0,23$  y  $pD_2$  de  $4,763 \pm 0,23$   $n = 4$  (tabla 5). La figura 28 representa su curva de contracción.

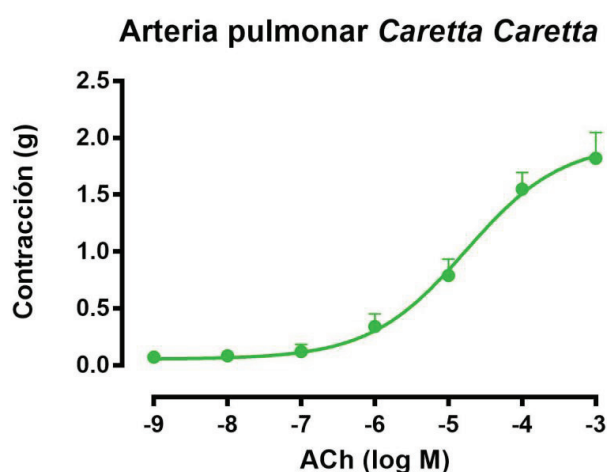


Figura 28: Curva dosis respuesta de la arteria pulmonar (AP) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a acetilcolina (ACh).

		5HT	ACh
ARTERIA	$E_{max}$ (g)	$2,72 \pm 0,48$	$1,82 \pm 0,23$
	$pD_2$	$6,046 \pm 0,32$	$4,763 \pm 0,23$
PULMONAR	n	6	4

Tabla 5: Efecto máximo y potencia de la serotonina (5HT) y la acetilcolina (ACh) en la arteria pulmonar (AP) de tortuga marina *Caretta caretta*.

En la figura 29 comparamos las respuestas obtenidas con serotonina y acetilcolina. En ella observamos que comparando ambos neurotransmisores la serotonina es más potente y produce un efecto máximo mayor.

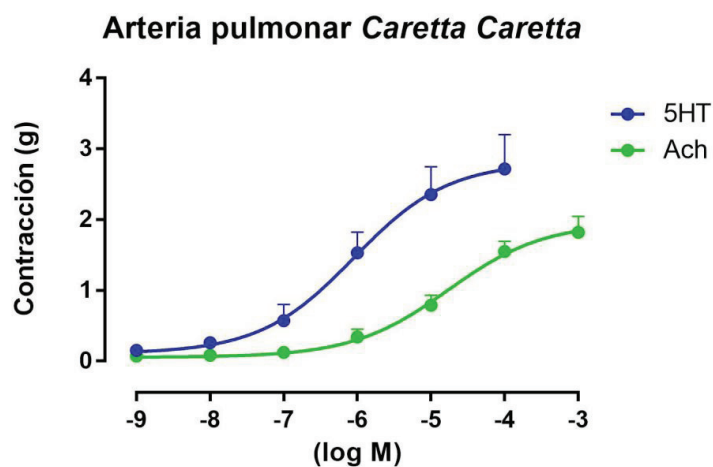


Figura 29: Curva dosis respuesta de la arteria pulmonar (AP) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a serotonina (5HT) y acetilcolina (ACh).

#### 4.1.1.1.3 Efecto de la adrenalina:

En la arteria pulmonar la adrenalina provoca una relajación dosis dependiente con un  $E_{max}$  del  $63,2 \pm 11,9\%$  respecto de la máxima relajación obtenida con papaverina (0,3 Mm) y un  $pD_2$  de  $7,152 \pm 0,54$   $n = 3$  (tabla 6). Su curva de relajación está representada en la figura 30.

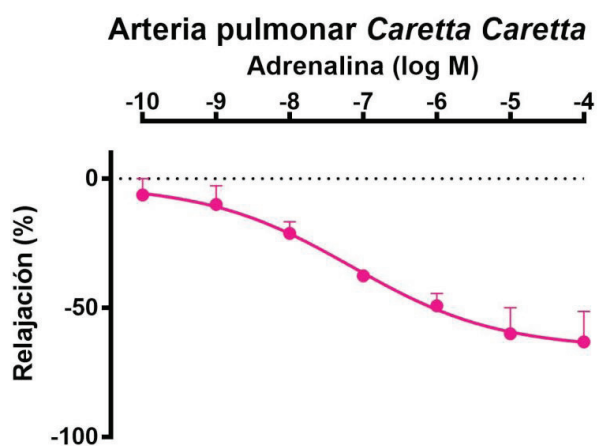


Figura 30: Curva dosis respuesta de la arteria pulmonar (AP) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a adrenalina. La relajación se expresa en % de la relajación producida por la papaverina.

		ADRENALINA	
		$E_{max}$ (% Papav.)	$-63,2 \pm 11,9\%*$
ARTERIA		$pD_2$	$7,152 \pm 0,54$
PULMONAR		n	3

Tabla 6: Efecto máximo y potencia de la adrenalina en la arteria pulmonar (AP) de tortuga marina *Caretta caretta*.

#### 4.1.1.2 Caracterización de las respuestas in vitro del esfínter de la arteria pulmonar:

##### 4.1.1.2.1 Efecto de la serotonina:

En el esfínter de la arteria pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $7,06 \pm 1,10$  y  $pD_2$  de  $5,934 \pm 0,411$  n = 6 (tabla 7). En la figura 31 está representada su curva de contracción.

#### Esfínter arteria pulmonar *Caretta Caretta*

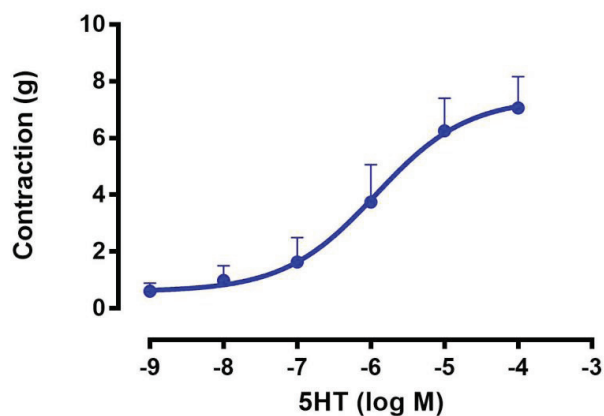


Figura 31: Curva dosis respuesta del esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a serotonina (5HT).



#### 4.1.1.2.2 Efecto de la acetilcolina:

En el esfínter de la arteria pulmonar la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $7,75 \pm 1,44$  y  $pD_2$  de  $5,148 \pm 1,07$ ,  $n = 9$  (tabla 7). Su curva de contracción se representa en la figura 32.

#### Esfínter arteria pulmonar *Caretta Caretta*

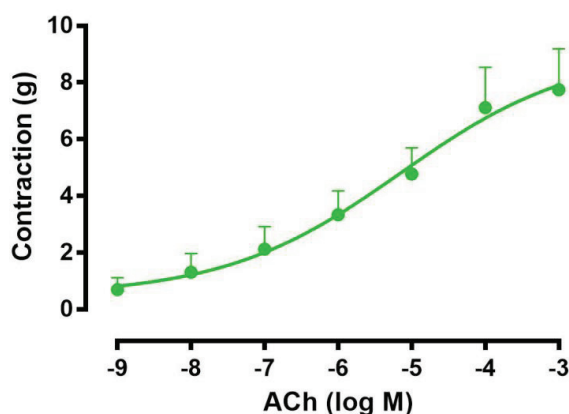


Figura 32: Curva dosis respuesta del esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a acetilcolina (ACh).

		5HT	ACh
ESFÍNTER DE LA ARTERIA PULMONAR	$E_{max}$ (g)	$7,06 \pm 1,10$	$7,75 \pm 1,44$
	$pD_2$	$5,934 \pm 0,41$	$5,148 \pm 1,07$
	n	6	9

Tabla 7: Efecto máximo y potencia de la serotonina (5HT) y la acetilcolina (ACh) en el esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta*.

La figura 32 representa la respuesta contráctil obtenida en la arteria pulmonar tanto en presencia de serotonina como de acetilcolina, en este caso las diferencias en cuanto a potencia no son significativas, al contrario de lo que sucedía en el tramo de arteria pulmonar.

### Esfínter arteria pulmonar *Caretta Caretta*

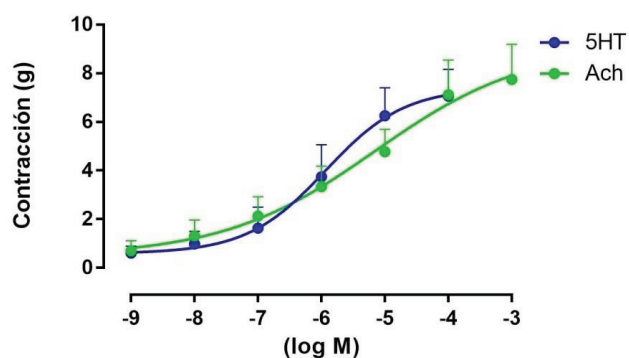


Figura 32: Efecto contráctil de la serotonina (5HT) y la acetilcolina (ACh) en el esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta*.

#### 4.1.1.2.3 Efecto de la adrenalina:

En el esfínter de la arteria pulmonar la adrenalina provoca una relajación dosis dependiente con un  $E_{max}$  del  $66,0 \pm 8,2\%$  respecto de la máxima relajación obtenida con papaverina (0,3 Mm) y un  $pD_2$  de  $5,655 \pm 0,48$ ,  $n = 10$  (tabla 8). Su curva de relajación se representa en la figura 33.

### Esfínter arteria pulmonar *Caretta Caretta*

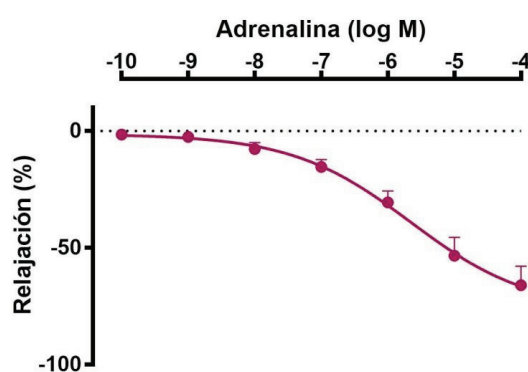


Figura 33: Curva dosis respuesta del esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a adrenalina. La relajación se expresa en % de la relajación producida por la papaverina.

ADRENALINA		
ESFÍNTER DE LA ARTERIA PULMONAR	$E_{\max}$ (% Papav.)	-66,0±8,2%
	$pD_2$	5,655±0,48
	n	10

Tabla 8: Efecto máximo y potencia de la adrenalina en el esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta*.

En la figura 34 se representa la curva de relajación producida por la adrenalina tanto en la arteria pulmonar como en el esfínter de la arteria pulmonar, donde se observa que la adrenalina es más potente a nivel del esfínter.

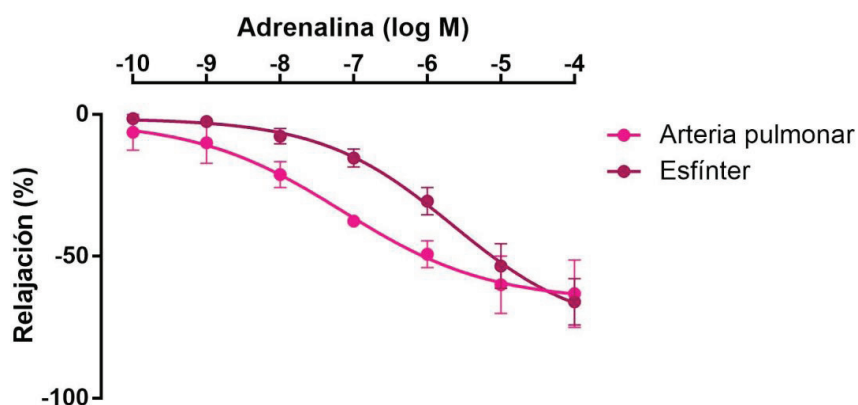


Figura 34: Comparación del efecto relajante de la adrenalina sobre la arteria pulmonar (AP) y el esfínter de la arteria pulmonar (ESF) en tortuga marina *Caretta caretta*. La relajación se expresa en % de la relajación producida por la papaverina.

### 4.1.1.3 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria intrapulmonar:

#### 4.1.1.3.1 efecto de la serotonina:

En la arteria intrapulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $2,94 \pm 0,94$  y  $pD_2$  de  $5,931 \pm 0,44$   $n = 6$  (tabla 9). Su curva de contracción se representa en la figura 35.

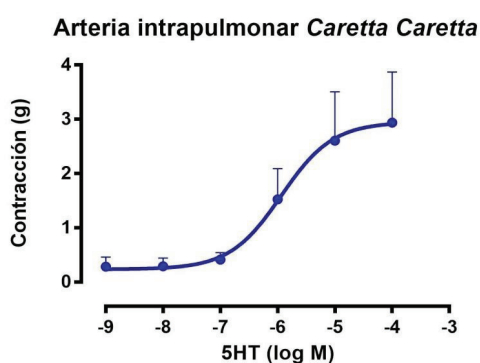


Figura 35: Curva dosis respuesta de la arteria intrapulmonar (AIP) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a serotonina (5HT).

#### 4.1.1.3.2 Efecto de la acetilcolina:

En la arteria intrapulmonar la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $2,45 \pm 0,36$  y  $pD_2$  de  $6,235 \pm 0,28$   $n = 6$  (tabla 9). Su curva de contracción se representa en la figura 36.

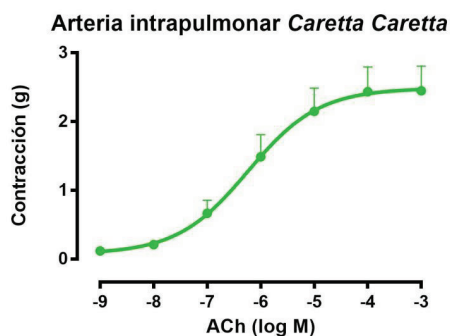


Figura 36: Curva dosis respuesta de la arteria intrapulmonar (AIP) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a acetilcolina (ACh).

#### 4.1.1.3.3 Efecto de la adrenalina:

En la arteria intrapulmonar la contracción inducida por la adrenalina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,104 \pm 0,47$  y  $pD_2$  de  $5,696 \pm 0,49$   $n = 5$  (tabla 9). Su curva de contracción se representa en la figura 37.

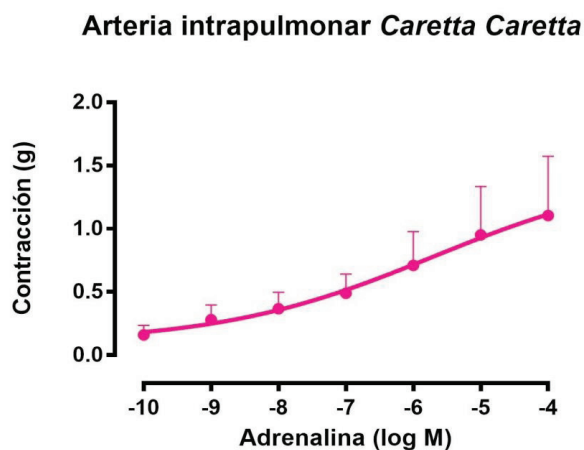


Figura 37: Curva dosis respuesta de la arteria intrapulmonar (AIP) de tortuga marina *Caretta caretta* frente a adrenalina.

	5HT	ACh	ADRENALINA
<b>ARTERIA</b>	$E_{max}$ (g)	$2,94 \pm 0,94$	$2,45 \pm 0,36$
	$pD_2$	$5,931 \pm 0,44$	$6,235 \pm 0,28$
<b>INTRAPULMONAR</b>	n	6	5

Tabla 9: Efecto máximo y potencia de la serotonina (5HT) y la acetilcolina (ACh) y la adrenalina en la arteria intrapulmonar (AIP) de tortuga marina *Caretta caretta*.

En la figura 38 Se representan la acción de los tres neurotransmisores: serotonina, acetilcolina y adrenalina sobre la arteria intrapulmonar. En el caso de la arteria intrapulmonar, y a diferencia de lo que sucede en la arteria pulmonar y su esfínter, la adrenalina produce la contracción del tejido. De los tres compuestos ensayados observamos que el más potente es la acetilcolina.

### Arteria intrapulmonar *Caretta Caretta*

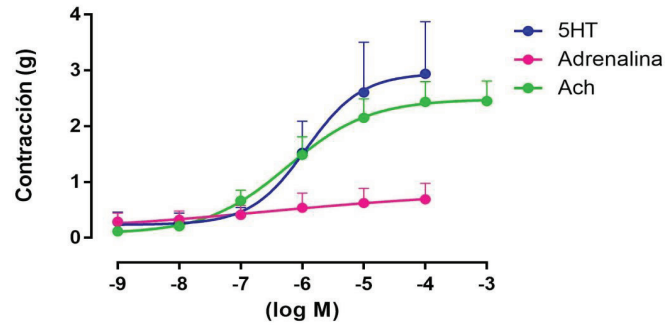


Figura 38: Efecto contráctil de la serotonina (5HT), la acetilcolina (ACh) y la adrenalina en la arteria intrapulmonar de tortuga marina *Caretta caretta*.

### 4.1.1.4 Caracterización de las respuestas in vitro del parénquima pulmonar:

#### 4.1.1.4.1 Efecto de la serotonina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,07 \pm 0,11$  y  $pD_2$  de  $5,875 \pm 0,83$   $n = 6$  (tabla 10). Su curva de contracción se representa en la figura 39.

### Parénquima pulmonar *Caretta Caretta*

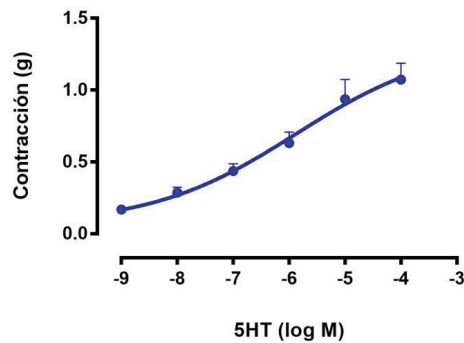


Figura 39: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* frente a serotonina (5HT).

#### 4.1.1.4.2 Efecto de la acetilcolina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $3,76 \pm 0,52$  y  $pD_2$  de  $5,266 \pm 1,24$   $n = 6$  (tabla 10). Su curva de contracción se representa en la figura 40.

#### Parénquima pulmonar *Caretta Caretta*

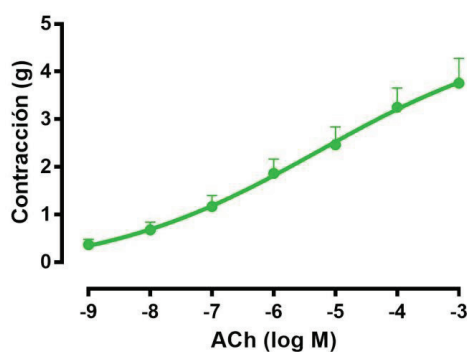


Figura 39: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* frente a acetilcolina (ACh).

#### 4.1.1.4.3 Efecto de la adrenalina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la adrenalina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,145 \pm 0,20$  y  $pD_2$  de  $6,682 \pm 1,62$ ,  $n = 11$  (tabla 10). Su curva de contracción se representa en la figura 41.

#### Parénquima pulmonar *Caretta Caretta*

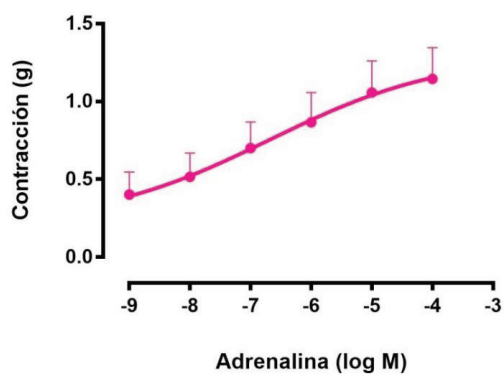


Figura 41: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* frente a adrenalina.

#### 4.1.1.4.4 Efecto de la histamina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la histamina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,071 \pm 0,18$  y  $pD_2$  de  $5,829 \pm 0,63$   $n=6$  (tabla 10). Su curva de contracción se representa en la figura 42.

#### Parénquima pulmonar *Caretta Caretta*

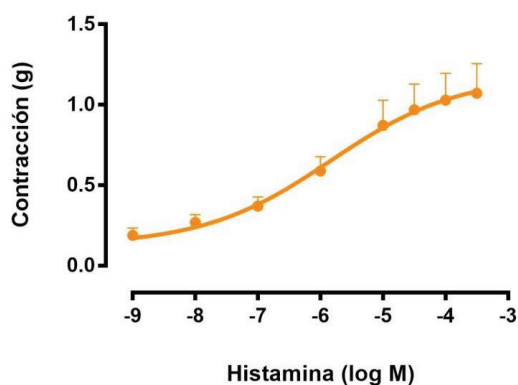


Figura 42: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* frente a histamina.

	5HT	ACh	ADRENALINA	HISTAMINA
<b>PARÉNQUIMA PULMONAR</b>				
$E_{max}$ (g)	$1,07 \pm 0,11$	$3,76 \pm 0,52$	$1,145 \pm 0,20$	$1,071 \pm 0,18$
$pD_2$	$5,875 \pm 0,83$	$5,266 \pm 1,24$	$6,682 \pm 1,62$	$5,829 \pm 0,63$
n	6	6	11	6

Tabla 10: Efecto máximo y potencia de la serotonina (5HT) y la acetilcolina (ACh), la adrenalina y la histamina en el parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta*.

En la figura 43 Se representan la acción de los cuatro compuestos: serotonina, acetilcolina, histamina y adrenalina sobre el parénquima pulmonar.



### Parénquima pulmonar *Caretta Caretta*

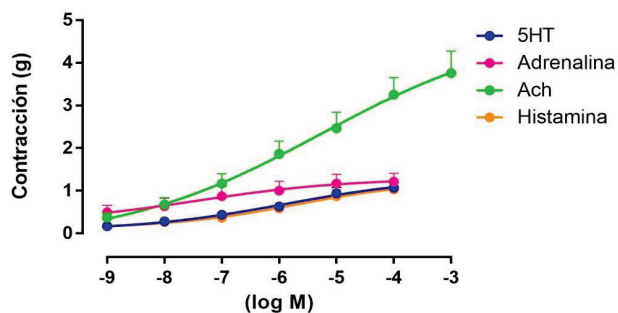


Figura 43: Efecto contráctil de la serotonina (5HT), la acetilcolina (ACh), histamina y la adrenalina en el parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta*.

### 4.1.1.5 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria

#### sistémica:

La arteria sistémica empleada para el estudio fue la arteria aorta derecha.

#### 4.1.1.5.1 Efecto de la acetilcolina:

En la arteria sistémica la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $5,24 \pm 1,14$  y  $pD_2$  de  $6,35 \pm 0,31$ ,  $n = 5$  (tabla 11). Su curva de contracción se representa en la figura 44.

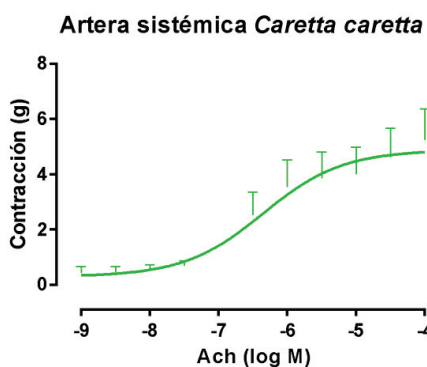


Figura 44: Curva dosis respuesta de la arteria sistémica de tortuga marina *Caretta caretta* frente a acetilcolina (ACh).

#### 4.1.1.5.2 Efecto de la adrenalina:

En la arteria sistémica la contracción inducida por la adrenalina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $5,087 \pm 0,17$  y  $pD_2$  de  $5,878 \pm 0,15$ ,  $n = 3$  (tabla 11). Su curva de contracción se representa en la figura 45.

		ACh	ADRENALINA
ARTERIA	$E_{max}$ (g)	$5,24 \pm 1,14$	$5,087 \pm 0,17$
	$pD_2$	$6,35 \pm 0,31$	$5,878 \pm 0,15$
SISTÉMICA	n	5	3

Tabla 11: Efecto máximo y potencia de la acetilcolina (ACh) y la adrenalina en la arteria sistémica de tortuga marina *Caretta caretta*.

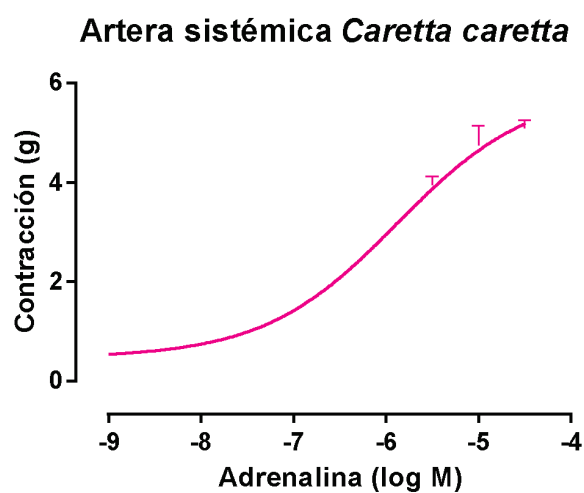


Figura 45: Curva dosis respuesta de la arteria sistémica de tortuga marina *Caretta caretta* frente a adrenalina.

#### 4.1.2 Descripción histológica de la arteria pulmonar y el esfínter de la arteria pulmonar

El esfínter de la arteria pulmonar en *Caretta caretta* fue descrito por primera vez en 1978 [37, 38]. Éste esfínter ocupa dos tercios de la longitud total de la arteria pulmonar y se encuentra en la zona proximal al pulmón. Los hallazgos histológicos observados en la arteria pulmonar son consistentes con los descritos previamente en arterias elásticas en otras especies, es decir, una gran luz y una delgada pared con una cantidad moderada de fibras musculares lisas y elásticas en la túnica media (Figura 46: 1). La región del esfínter, sin embargo, se caracteriza por la presencia de una pared más gruesa con un lumen más estrecho y una mayor rugosidad de la capa íntima. La túnica media está compuesta principalmente por haces gruesos de músculo liso dispuestos en pliegues transversales circulares y con menos fibras elásticas (Figura 46: 2).

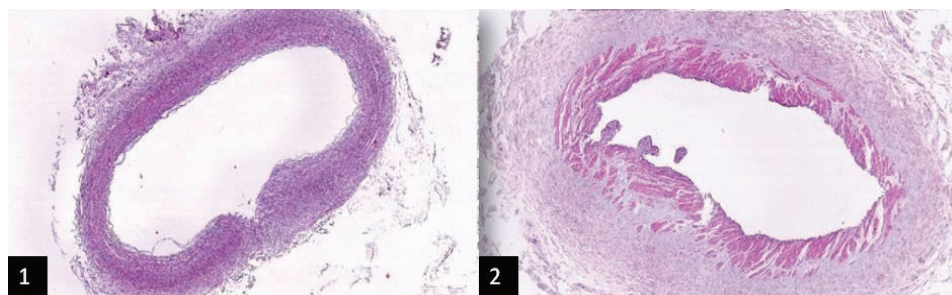


Figura 46: Imágenes histológicas teñidas con hematoxilina- eosina de la arteria pulmonar y el esfínter de la arteria pulmonar de *Caretta caretta*.

Estos hallazgos son especialmente evidentes una vez que todo el vaso se ha fijado con paraformaldehído al 4% durante 48 horas debido a la retracción tisular que, de hecho, es mucho más alta a nivel del esfínter, donde la capa muscular media es más gruesa. En *Trachemys scripta* el esfínter no está presente y las características histológicas de la arteria son similares a las descritas para la arteria pulmonar en *Caretta caretta*.

La tinción de Masson nos permite visualizar mejor las fibras musculares en los diferentes tejidos. Tanto en la arteria pulmonar de *Caretta caretta* (figura 47a) como en la de

*Trachemys Scripta* (figura 47b) se visualiza una gran luz y una pared arterial delgada compuesta por fibras elástica y colágeno mezclado con haces delgados de fibras musculares lisas (los recuadros superiores de las imágenes muestran las paredes al detalle). En el caso del esfínter de la arteria pulmonar de *Caretta caretta* podemos observar tanto en la sección transversal (figura 47c) como en la sección longitudinal (figura 47d) que la túnica media muestra haces gruesos de músculo liso dispuestos en pliegues circunferenciales parecidos a acordeones (los recuadros superiores muestran los pliegues musculares del esfínter al detalle). En el caso del corte histológico de pulmón de *Caretta caretta* (figura 47e) así como el de *Trachemys scripta* (figura 47f) revelan la presencia de haces musculares lisos dentro del parénquima pulmonar.

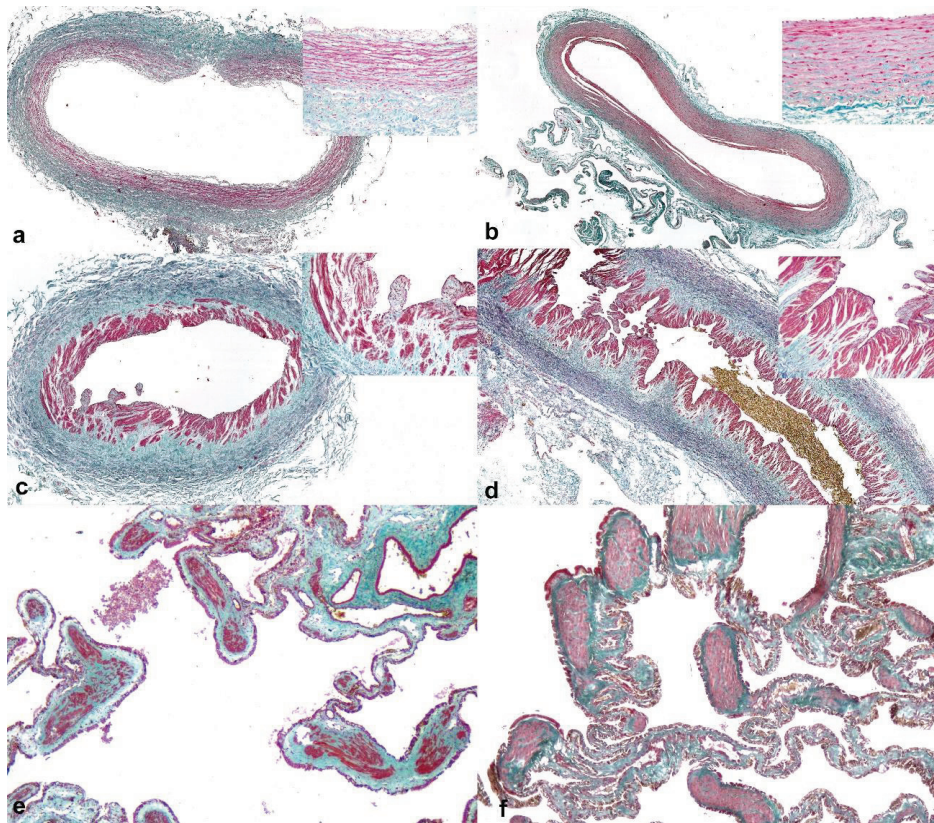


Figura 47: Imágenes histológicas con tinción de Masson de diversos tejidos de *Caretta caretta* y *Trachemys scripta*. Arteria pulmonar (a), esfínter de la arteria pulmonar (c y d) y parénquima pulmonar (e) de *Caretta caretta*. Arteria pulmonar (b) y parénquima pulmonar (f) de *Trachemys scripta*.

#### **4.1.3 Estudio de la distribución y expresión de los receptores muscarínicos y adrenérgicos en el esfínter de la arteria pulmonar y el parénquima pulmonar**

Dada la importancia hasta ahora comentada de neurotransmisores como la adrenalina y la acetilcolina se decidió estudiar la expresión y distribución de los receptores adrenérgicos y muscarínicos en el esfínter de la arteria pulmonar y el parénquima pulmonar principalmente.

Para ello se llevaron a cabo inmunotinciones de secciones histológicas del esfínter de la arteria pulmonar y del parénquima pulmonar y western blot del esfínter de la arteria pulmonar, arteria intrapulmonar y parénquima pulmonar empleando anticuerpos dirigidos a los distintos tipos de receptores de interés. En el caso del western blot se emplearon también muestras de arteria pulmonar humana y parénquima pulmonar humano como controles positivos puesto que los anticuerpos utilizados están diseñados para esta especie, no habiendo anticuerpos para nuestra especie de estudio.

La figura 48 muestra imágenes de secciones histológicas del esfínter de la arteria pulmonar inmuno teñidas con anticuerpos dirigidos a los distintos receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , y con mayor intensidad  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , se localizan en la periferia. En el caso del receptor  $\beta_2$  se observó una importante expresión y una distribución del receptor principalmente a lo largo del citoplasma celular de las células musculares lisas. Los resultados del western blot muestran principalmente receptores  $\beta_1$  y en mayor medida  $\beta_2$  (figura 53).

Por lo que respecta a la expresión de receptores adrenérgicos en el parénquima pulmonar encontramos en su mayoría receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  en el sistema vascular, así como receptores  $\alpha_2$  en menor medida. Como ya hemos indicado anteriormente la histología pulmonar de estas especies difiere en gran medida a la humana, en la que encontramos receptores adrenérgicos  $\beta_2$  en el músculo liso bronquial. La figura 49 muestra de nuevo la expresión de los cuatro receptores, pero en este caso en secciones histológicas de tejido pulmonar.

La figura 53 nos muestra los resultados obtenidos a través de western blot que confirman la presencia de receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y un componente muy leve de receptores  $\beta_2$ .

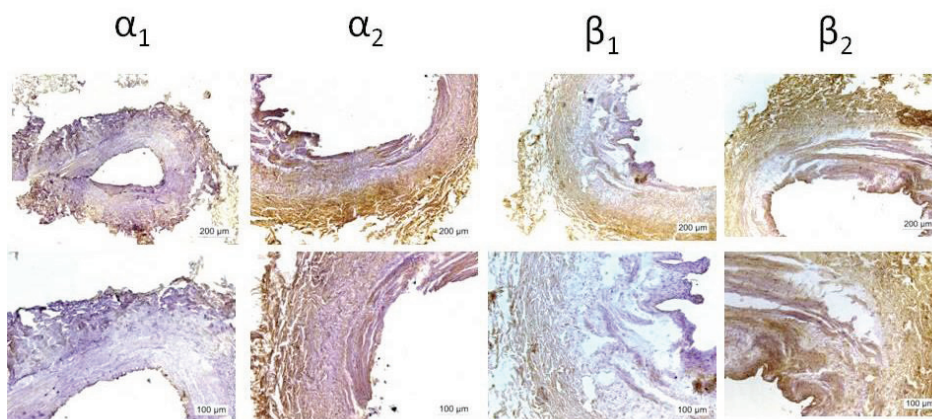


Figura 48: Expresión de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  en el esfínter de la arteria pulmonar de tortugas marinas *Caretta caretta*. Imágenes de secciones histológicas representativas del esfínter de la arteria pulmonar. Estas secciones fueron inmuno teñidas con anticuerpos anti-  $\alpha_1$ , anti-  $\alpha_2$ , anti-  $\beta_1$  y anti-  $\beta_2$ . El tejido fue contra teñido con hematoxilina. La barra de escala de las imágenes superiores corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . La barra de escala de las imágenes inferiores corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

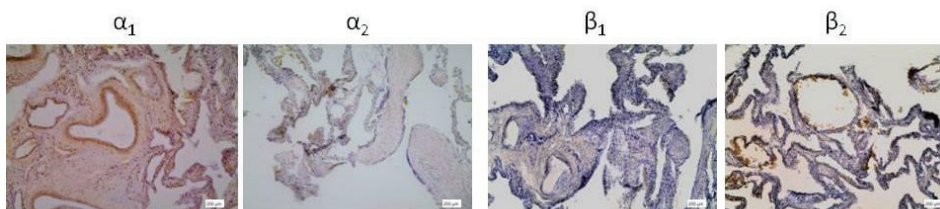


Figura 49: Expresión de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  en el parénquima pulmonar de tortugas marinas *Caretta caretta*. Imágenes de secciones histológicas representativas del parénquima pulmonar. Estas secciones fueron inmuno teñidas con anticuerpos anti-  $\alpha_1$ , anti-  $\alpha_2$ , anti-  $\beta_1$  y anti-  $\beta_2$ . El tejido fue contra teñido con hematoxilina. La barra de escala de las imágenes corresponde a 200  $\mu\text{m}$ .

En el caso de los receptores muscarínicos en el esfínter de la arteria pulmonar cabe destacar que el receptor presente de forma más significativa es del tipo M3 según los resultados de la inmunohistoquímica. La figura 50 nos indica la presencia principalmente de receptores muscarínicos tipo M3 en el músculo liso que conforma el esfínter de la arteria pulmonar de *Caretta caretta*.

En el caso del receptor muscarínico tipo M2, también presente en otras especies en músculo liso, podemos observar una leve presencia en las células musculares lisas. En la figura 53 se muestra la presencia de receptores M3 principalmente en el esfínter de la arteria pulmonar a través de western blot.

La figura 51 muestra la expresión de los receptores M1 y M5 en secciones histológicas de tejido pulmonar. Ni en los cortes inmunoteñidos ni en los resultados del western blot observamos la presencia de receptores M1. En el caso de la figura 52 se muestra la expresión de los receptores M2, M3 y M4 en secciones histológicas de parénquima pulmonar. Además en el western blot observamos la presencia de receptores M2, y principalmente, de receptores M3.

Debido a la disponibilidad de muestras y la necesidad de su mayor aprovechamiento decidimos no realizar western blot para los receptores M4 y M5 ya que incluso en tejido humano aún son receptores en estudio en los diferentes tejidos.

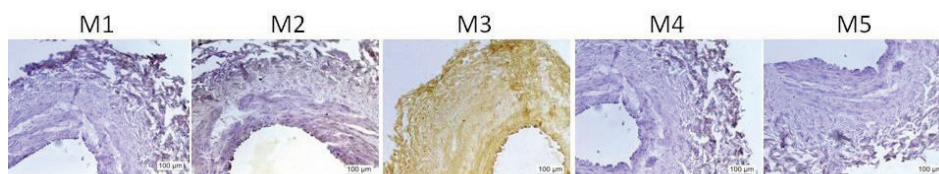


Figura 50: Expresión de receptores muscarínicos M1, M2, M3, M4 y M5 en el esfínter de la arteria pulmonar de tortugas marinas *Caretta caretta*. Imágenes de secciones histológicas representativas del esfínter de la arteria pulmonar. Estas secciones fueron inmuno teñidas con anticuerpos anti- M1, anti- M2, anti- M3, anti- M4 y anti- M5. El tejido fue contra teñido con hematoxilina. La barra de escala de las imágenes corresponde a 100 µm.

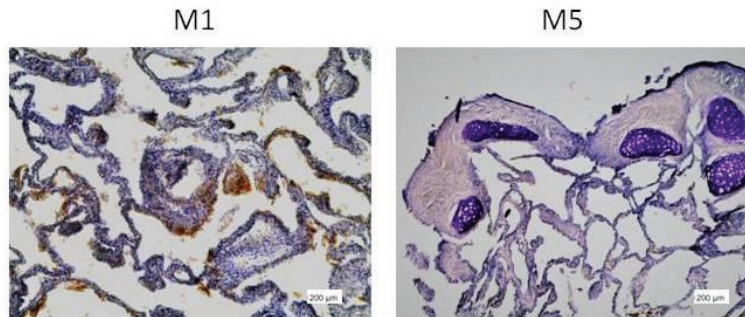


Figura 51: Expresión de receptores muscarínicos M1 y M5 en el parénquima pulmonar de tortugas marinas *Caretta caretta*. Imágenes de secciones histológicas representativas del parénquima pulmonar. Estas secciones fueron inmuno teñidas con anticuerpos anti- M1 y anti- M5. El tejido fue contra teñido con hematoxilina. La barra de escala de las imágenes corresponde a 200 µm.

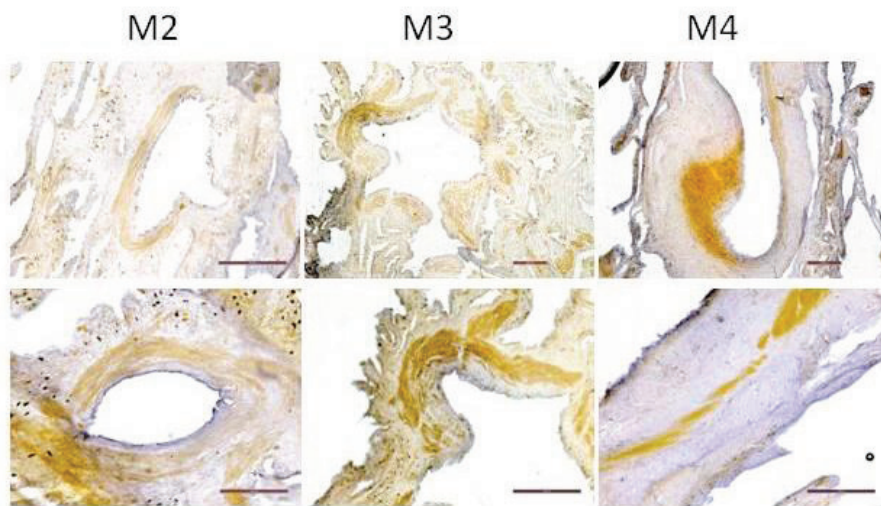


Figura 52: Expresión de receptores muscarínicos M2, M3 y M4 en el parénquima pulmonar de tortugas marinas *Caretta caretta*. Imágenes de secciones histológicas representativas del parénquima pulmonar. Estas secciones fueron inmuno teñidas con anticuerpos anti- M2, anti- M3 y anti- M4. El tejido fue contra teñido con hematoxilina. La barra de escala de las imágenes superiores corresponde a 200 µm. La barra de escala de las imágenes inferiores corresponde a 100 µm.



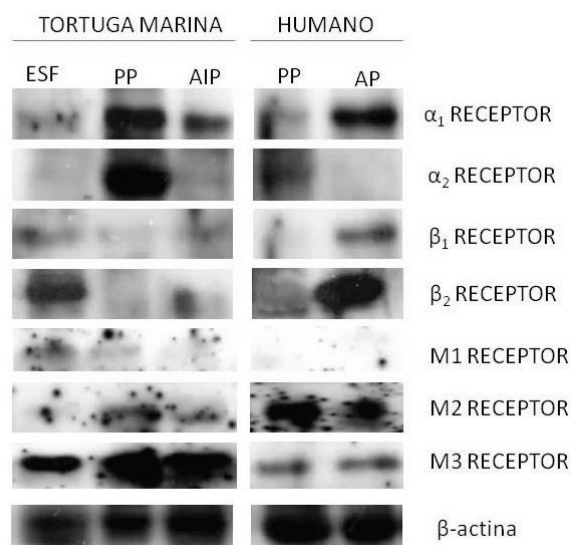


Figura 53: Expresión de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  y muscarínicos M2, M3 y M4 en el esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortugas marinas *Caretta caretta*, parénquima pulmonar (PP) de tortugas marinas *Caretta caretta* y arteria intrapulmonar (AIP) de la misma especie. Se muestran también los controles en parénquima pulmonar (PP) humano y en arteria pulmonar (AP) humana.

## 4.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN TORTUGAS MARINAS NEONATAS (*Caretta caretta*):

### 4.2.1 Estudios funcionales:

#### 4.2.1.1 Caracterización de las respuestas in vitro del esfínter de la arteria pulmonar:

##### 4.2.1.1.1 Efecto de la serotonina:

En el esfínter de la arteria pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $2,31 \pm 0,83$  y  $pD_2$  de  $5,273 \pm 0,45$   $n = 4$  (Tabla 12) Su curva de contracción se representa en la figura 54.

### Esfínter arteria pulmonar *Caretta caretta* neonata

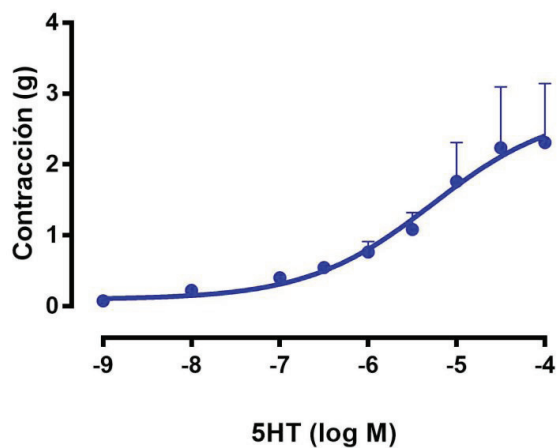


Figura 54: Curva dosis respuesta del esfínter de la arteria pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata frente a serotonina (5HT).

#### 4.2.1.1.2 Efecto de la acetilcolina:

En el esfínter de la arteria pulmonar la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,183 \pm 0,09$  y  $pD_2$  de  $6,784 \pm 0,18$   $n = 8$  (Tabla 12) Su efecto contráctil está representado en la figura 55.

### Esfínter arteria pulmonar *Caretta caretta* neonata

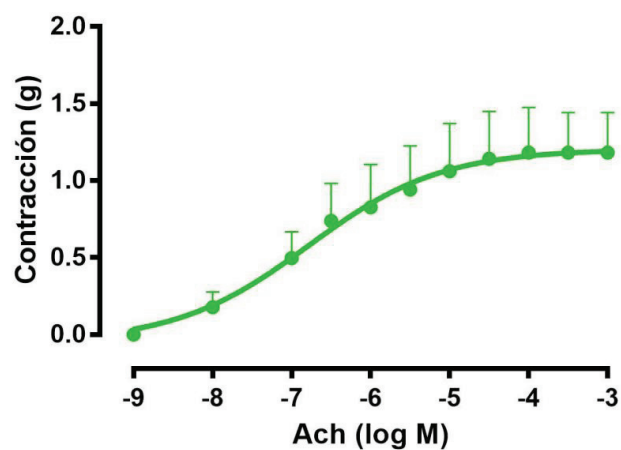


Figura 55: Curva dosis respuesta del esfínter de la arteria pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata frente a acetilcolina (ACh).

ESFÍNTER DE		5HT	ACh
LA	$E_{max}$ (g)	2,31±0,83	1,183±0,09
ARTERIA	$pD_2$	5,273±0,45	6,784±0,18
PULMONAR	n	4	8

Tabla 12: Efecto máximo y potencia de la serotonina (5HT) y la acetilcolina (ACh) en la arteria pulmonar (AP) de tortuga marina *Caretta caretta* neonata.

En la figura 56 Se representan la acción de los dos neurotransmisores: serotonina y acetilcolina sobre el esfínter de la arteria pulmonar en tortugas marinas neonatas.

#### Esfínter arteria pulmonar *Caretta caretta* neonata

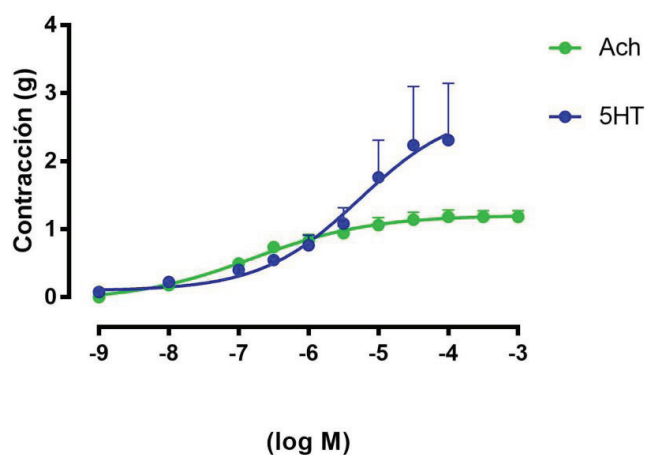


Figura 56: Efecto de la serotonina (5HT), acetilcolina (ACh) y adrenalina en el esfínter de la arteria pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata.

#### 4.2.1.1.3 Efecto de la adrenalina:

En el esfínter de la arteria pulmonar la respuesta inducida por la adrenalina es relajante con un  $E_{max}$  (% de Papav.) de 31,28±2,87 y un  $pD_2$  de 6,156±1,27, n =11 (Tabla 13). La figura 57 representa su curva de relajación.

### Esfínter arteria pulmonar *Caretta caretta* neonata

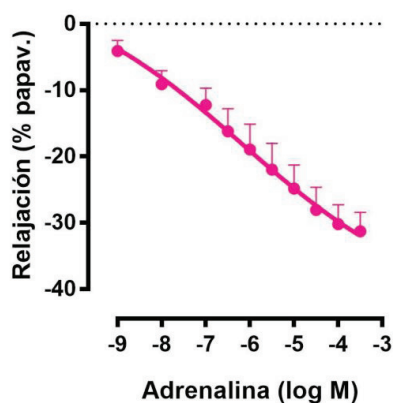


Figura 57: Curva dosis respuesta del esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta* neonata frente a adrenalina.

ESFÍNTER		ADRENALINA
DE LA	$E_{max}$ (% de Papav.)	$-31,28 \pm 2,87$
ARTERIA	$pD_2$	$6,156 \pm 1,27$
PULMONAR	n	11

Tabla 13: Efecto máximo y potencia de la adrenalina en el esfínter de la arteria pulmonar (ESF) de tortuga marina *Caretta caretta* neonata.

#### 4.2.1.2 Caracterización de las respuestas in vitro del parénquima pulmonar:

##### 4.2.1.2.1 Efecto de la acetilcolina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,930 \pm 0,33$  y  $pD_2$  de  $5,248 \pm 0,55$  n =13 (Tabla 14). Su curva de contracción está representada en la figura 58.

### Parénquima pulmonar *Caretta Caretta* neonata

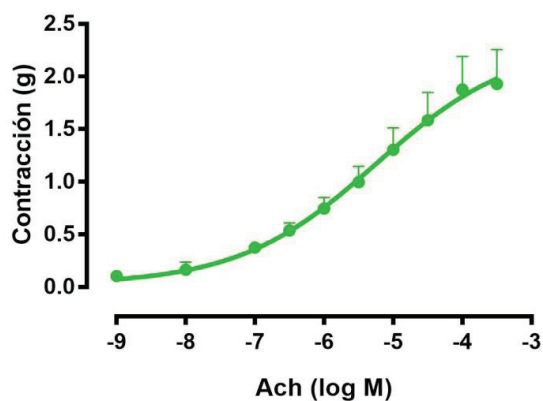


Figura 58: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata frente a acetilcolina (ACh).

#### 4.2.1.2.2 Efecto de la adrenalina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la adrenalina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $0,56 \pm 0,06$  y  $pD_2$  de  $5,864 \pm 0,25$ ,  $n = 8$  (Tabla 14). La curva de contracción está representada en la figura 59.

### Parénquima pulmonar *Caretta Caretta* neonata

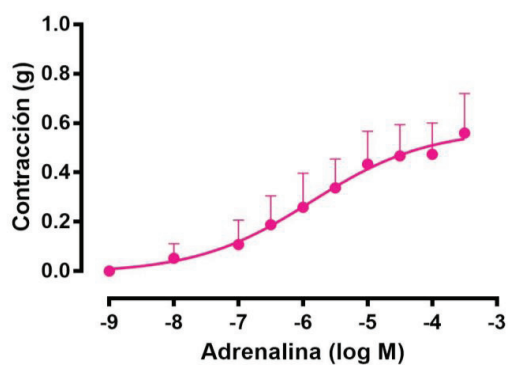


Figura 59: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata frente a adrenalina.

#### 4.2.1.2.3 Efecto de la histamina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la histamina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $0,952 \pm 0,12$  y  $pD_2$  de  $6,315 \pm 0,78$   $n = 13$  (Tabla 14). La figura 60 representa su curva de contracción.

**Parénquima pulmonar *Caretta Carreta* neonata**

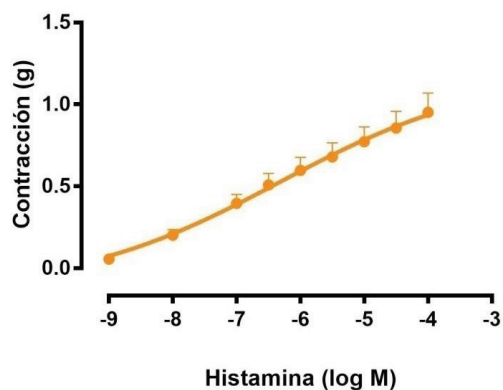


Figura 60: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata frente a histamina.

		ACh	ADRENALINA	HISTAMINA
PARÉNQUIM	$E_{max}$ (g)	$1,930 \pm 0,33$	$0,56 \pm 0,06$	$0,952 \pm 0,12$
	$pD_2$	$5,248 \pm 0,55$	$5,864 \pm 0,25$	$6,315 \pm 0,78$
A	n	13	8	13
PULMONAR				

Tabla 14: Efecto máximo y potencia de la acetilcolina (ACh), la adrenalina y la histamina en el parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata.

En la figura 61 encontramos representada la acción de la acetilcolina, la adrenalina y la histamina en el parénquima pulmonar.

## Parénquima pulmonar *Caretta Carreta* neonata

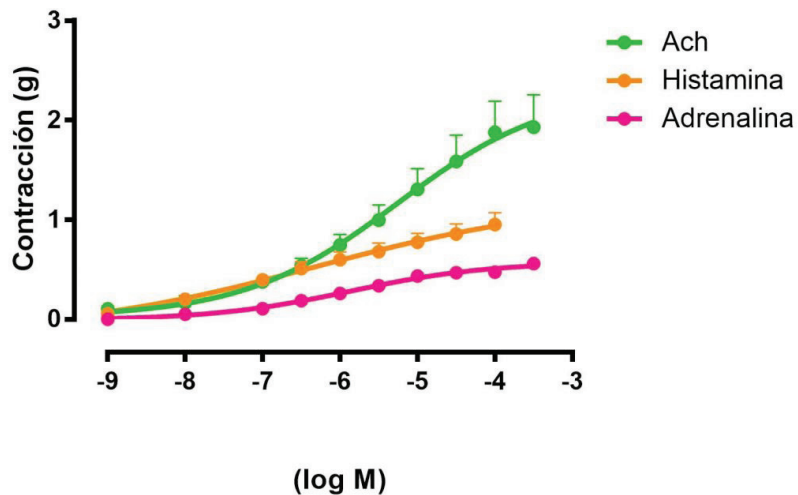


Figura 61: Efecto contráctil de la acetilcolina (ACh), la adrenalina y la histamina en el parénquima pulmonar de tortuga marina *Caretta caretta* neonata.

## 4.3 RESULTADOS OBTENIDOS EN TORTUGAS DE AGUA DULCE (*Trachemys scripta*):

### 4.3.1 Estudios funcionales:

#### 4.3.1.1 Caracterización de las respuestas in vitro de la arteria pulmonar:

##### 4.3.1.1.1 Efecto de la serotonina:

En la arteria pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $0,858 \pm 0,18$  y  $pD_2$  de  $5,039 \pm 0,62$   $n = 4$  (Tabla 15). Su contracción está representada en la figura 62.

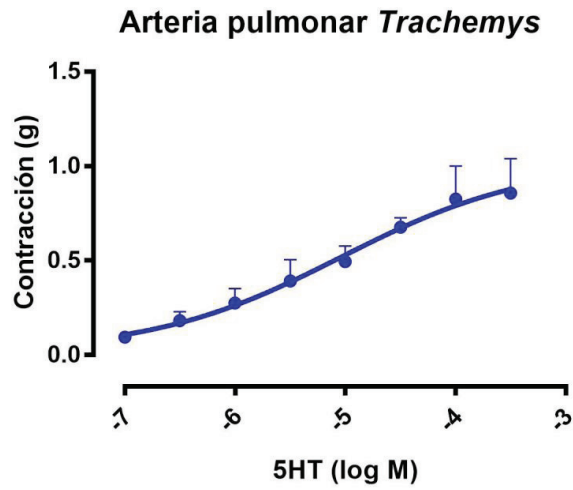


Figura 62: Curva dosis respuesta de la arteria pulmonar (AP) de tortuga de agua dulce *Trachemyscripta* frente a serotonina (5HT).

**4.3.1.1.2 efecto de la acetilcolina:**

En la arteria pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,825 \pm 0,005$  y  $pD_2$  de  $5,328 \pm 0,25$   $n = 3$  (Tabla 15). La figura 63 representa su curva de contracción.

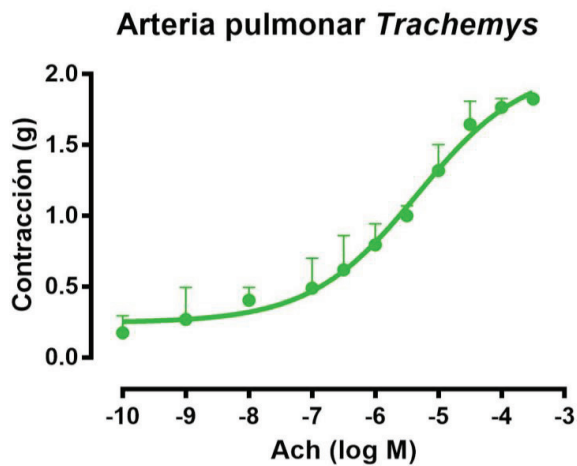


Figura 63: Curva dosis respuesta de la arteria pulmonar (AP) de tortuga de agua dulce *Trachemyscripta* frente a acetilcolina (ACh).



#### 4.3.1.1.3 Efecto de la adrenalina:

En la arteria pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,2 \pm 0,24$  y  $pD_2$  de  $6,735 \pm 0,39$   $n=5$  (Tabla 15). Su efecto contráctil está representado en la figura 64.

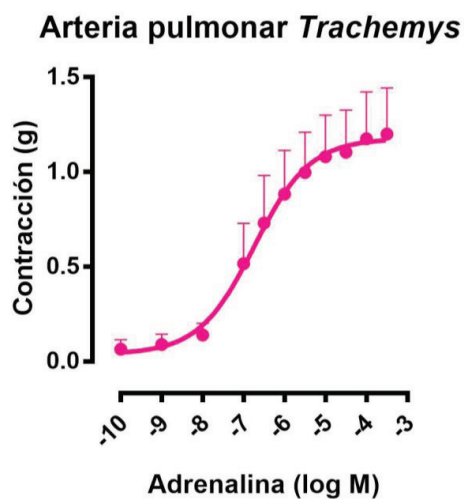


Figura 64: Curva dosis respuesta de la arteria pulmonar (AP) de tortuga de agua dulce *Trachemys scripta* frente a adrenalina.

		5HT	ACh	ADRENALINA
<b>ARTERIA</b>	$E_{max}$ (g)	$0,858 \pm 0,18$	$1,825 \pm 0,005$	$1,2 \pm 0,24$
	$pD_2$	$5,039 \pm 0,62$	$5,328 \pm 0,24$	$6,735 \pm 0,39$
<b>PULMONAR</b>	$n$	$4$	$3$	$5$

Tabla 15: Efecto máximo y potencia de la serotonina (5HT), acetilcolina (ACh) y la adrenalina en la arteria pulmonar de *Trachemys scripta*.

En la figura 65 se representan las curvas concentración respuesta en anillos de la arteria pulmonar frente a serotonina, acetilcolina y adrenalina.

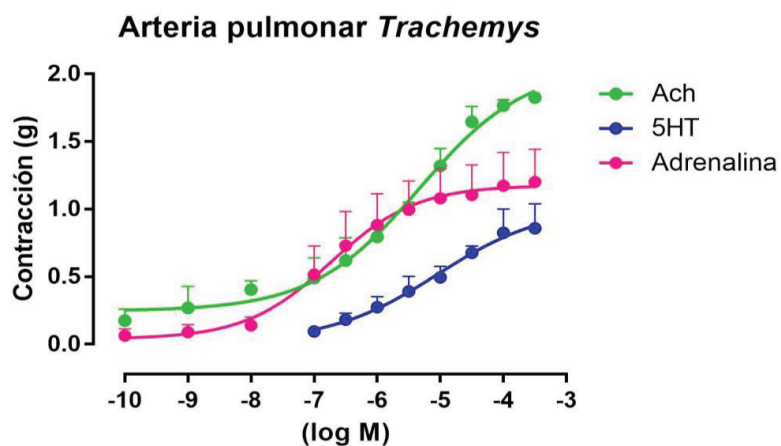


Figura 65: Efecto contráctil de la serotonina (5HT), la acetilcolina (ACh) y la adrenalina en la arteria pulmonar (AP) de *Trachemys scripta*.

#### 4.3.1.2 Caracterización de las respuestas in vitro del parénquima pulmonar:

##### 4.3.1.2.1 Efecto de la serotonina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la serotonina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,870 \pm 0,32$  y  $pD_2$  de  $4,223 \pm 0,52$   $n=8$  (Tabla 16). Su efecto está representado en la figura 66.

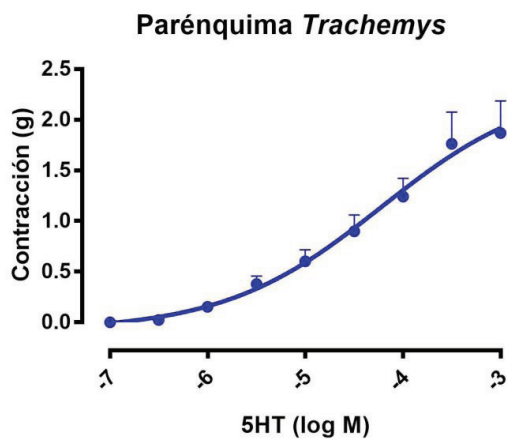


Figura 66: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de *Trachemys scripta* frente a serotonina (5HT).

#### 4.3.1.2.1 Efecto de la acetilcolina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la acetilcolina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,726 \pm 0,19$  y  $pD_2$  de  $5,003 \pm 0,54$   $n = 11$  (Tabla 16). Su efecto está representado en la figura 67.

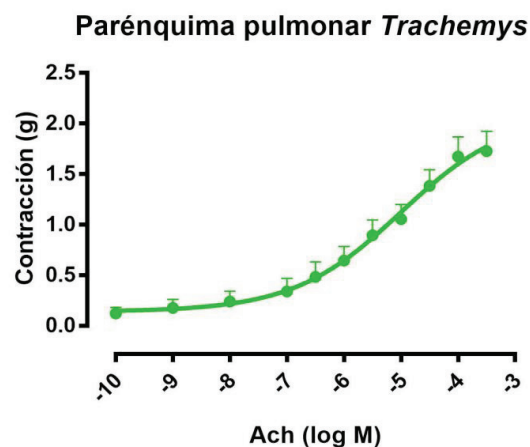


Figura 67: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de *Trachemys scripta* frente a acetilcolina (ACh).

#### 4.3.1.2.2 Efecto de la adrenalina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la adrenalina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $1,487 \pm 0,08$  y  $pD_2$  de  $5,877 \pm 0,09$   $n = 3$  (Tabla 16). La curva de contracción está representada en la figura 68.

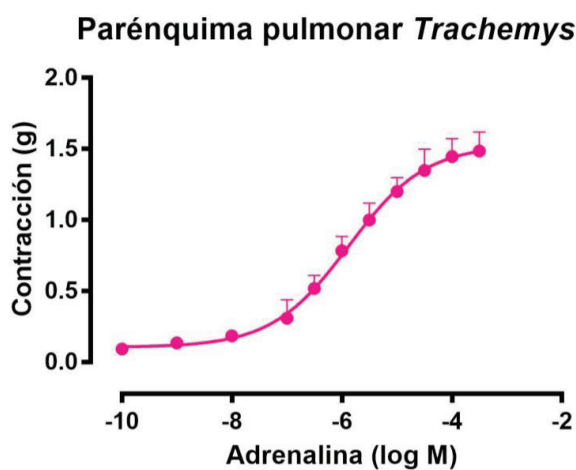


Figura 68: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de *Trachemys scripta* frente a adrenalina.

#### 4.3.1.2.3 Efecto de la histamina:

En el parénquima pulmonar la contracción inducida por la histamina tuvo un  $E_{max}$  (g) de  $2,106 \pm 0,27$  y  $pD_2$  de  $4,084 \pm 0,27$   $n = 8$  (Tabla 16). La curva de contracción está representada en la figura 69.

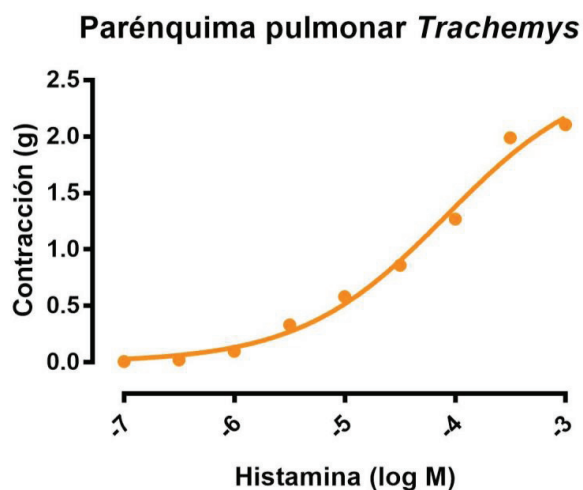


Figura 69: Curva dosis respuesta del parénquima pulmonar de tortuga de agua dulce *Trachemys scripta* frente a histamina.

		5HT	ACh	ADRENALINA	HISTAMINA
PARÉNQUIMA PULMONAR	$E_{max}$ (g)	$1,87 \pm 0,32$	$1,726 \pm 0,19$	$1,487 \pm 0,08$	$2,106 \pm 0,27$
	$pD_2$	$4,223 \pm 0,52$	$5,003 \pm 0,54$	$5,877 \pm 0,09$	$4,084 \pm 0,27$
	n	8	11	3	8

Tabla 16: Efecto máximo y potencia de la serotonina (5HT), acetilcolina (ACh), adrenalina e histamina en la arteria pulmonar de *Trachemys scripta*.

En la figura 70 encontramos representadas las curvas de contracción del parénquima pulmonar en presencia de acetilcolina, histamina y adrenalina.

### Parénquima pulmonar *Trachemys*

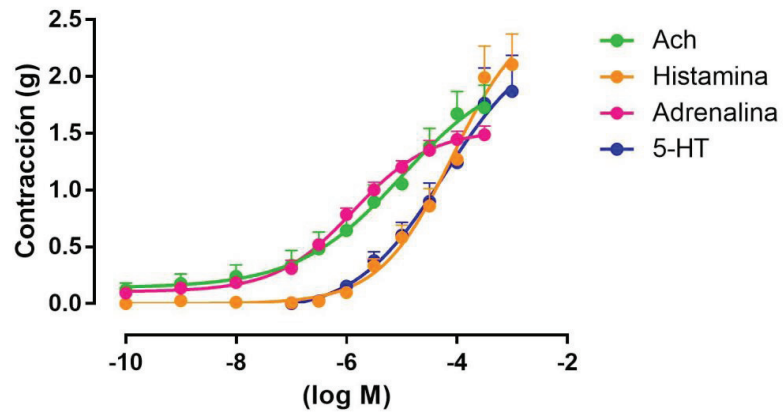


Figura 70: Efecto contráctil de la serotonina (5HT), la acetilcolina (ACh), la adrenalina y la histamina en el parénquima pulmonar de tortuga de agua dulce *Trachemys scripta*.



## **5. DISCUSIÓN**





Las respuestas obtenidas en los diferentes tejidos nos han llevado a entender el origen y la fisiopatología de esta enfermedad en *Caretta caretta*, hasta ahora nunca antes estudiada. El estudio ha sido realizado con el esfínter de la arteria pulmonar de la especie *Caretta caretta* debido a la disponibilidad de muestras, pero ha sido descrito en otras especies de tortugas marinas [37, 38, 53, 54]. En las especies de tortugas marinas que bucean a gran profundidad, como es el caso de *Dermochelys coriacea*, la pared muscular del esfínter de la arteria pulmonar presenta un mayor número y densidad de células musculares si se compara con la histología encontrada en *Caretta caretta* [54, 115].

Para entender la fisiopatología de esta enfermedad hemos estudiado la respuesta de los diferentes tejidos a los principales neurotransmisores del sistema nervioso simpático y parasimpático. Además, hemos comprobado la existencia de este esfínter en la arteria pulmonar de animales neonatos de la especie *Caretta caretta* y estudiado su funcionalidad. Por último, hemos comparado su respuesta con la obtenida en los mismos tejidos de tortugas de la especie *Trachemys scripta*, puesto que se trata de reptiles que no bucean a grandes profundidades.

A continuación se describen los principales resultados obtenidos en los tejidos procedentes de ejemplares de *Caretta caretta* adulta:

- La arteria pulmonar, el esfínter de la arteria pulmonar y las arterias intrapulmonares contraen cuando son expuestas a acetilcolina y serotonina, tal y como sucede en la arteria pulmonar humana y de otras especies de mamíferos [116-119] y está en línea con estudios previos en tortugas [29, 120].

- La contracción en presencia de acetilcolina a nivel del esfínter de la arteria pulmonar es más fuerte que en el resto de las regiones de la arteria, debido a la gran cantidad de células musculares que contiene su pared. Esta contracción también es más intensa que la obtenida en tortugas *Trachemys scripta*. Además, los resultados inmunohistoquímicos realizados en esta región nos indican la presencia principalmente de receptores muscarínicos tipo M2 y M3 en las células musculares lisas del esfínter de la arteria pulmonar, cuya función es contráctil. Este nivel de contracción supone la oclusión completa de la arteria.

- El parénquima pulmonar contrae en presencia de acetilcolina. En él podemos confirmar la presencia de receptores M2 localizados en las células musculares lisas y responsables de su contracción, receptores M3 también en las células musculares lisas y con función contráctil y receptores M4 responsable de la regulación de tono de la musculatura lisa. Para valorar la viabilidad del tejido también se empleó serotonina, siendo la respuesta del tejido contráctil.

- Cuando exponemos los tejidos frente adrenalina la respuesta obtenida es diferente. En el caso de las arterias intrapulmonares y el parénquima pulmonar la respuesta es contráctil. Por lo que respecta a la expresión de receptores adrenérgicos en el parénquima pulmonar encontramos en su mayoría receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  en el sistema vascular, responsables de su contracción. En el caso de la arteria pulmonar y su esfínter la respuesta es claramente vasodilatadora, en el caso del esfínter de la arteria pulmonar se observó una expresión positiva y una distribución del receptor adrenérgico  $\beta_2$  principalmente a lo largo del citoplasma celular de las células musculares lisas. Su acción supone la relajación de las células musculares lisas.

- Cabe destacar que los anticuerpos disponibles son de mamíferos por lo que la especificidad de los anticuerpos frente a los receptores en los reptiles sigue siendo incierta.

Los resultados obtenidos en ejemplares neonatos de *Caretta caretta* coinciden con los descritos en los ejemplares adultos, lo que indica que cuentan con este sistema desde el inicio.

En el caso de las respuestas obtenidas en los ejemplares de *Trachemys scripta* cabe destacar:

- A diferencia de lo que sucede en *Caretta caretta*, cuando exponemos los tejidos de *Trachemys scripta* frente a adrenalina la respuesta es contráctil en todos los casos.

Lo primero que debemos señalar es que los resultados demuestran la diferencia de la respuesta de la arteria pulmonar entre un buceador superficial (*Trachemys scripta*) y un buceador profundo (*Caretta caretta*).

Además, las tortugas de la especie *Trachemys scripta* no presentan esfínter en la arteria pulmonar, por lo que esta estructura anatómica supone una adaptación fisiológica crucial en

tortugas marinas. Las respuestas divergentes entre *Trachemys scripta* y las obtenidas en *Caretta caretta* muestran un mecanismo evolutivo distinto gracias al cual las tortugas marinas pueden evadir los problemas derivados de la presión, como es el síndrome descompresivo, así como gestionar sus reservas de oxígeno durante el buceo. El fallo de este mecanismo ayuda a explicar la elevada incidencia de embolia gaseosa encontrada en tortugas marinas capturadas por redes de pesca [12, 121].

La respuesta al buceo es un reflejo observado en estas tortugas marinas que ya hemos detallado anteriormente y que principalmente se trata de un conjunto de cambios cardiovasculares causados por el aumento del tono parasimpático. Como consecuencia produce bradicardia y vasoconstricción periférica, lo que supone una reducción del gasto cardiaco [13, 122, 123]. En condiciones normales esta respuesta se utiliza para conservar las reservas de oxígeno disponible para los órganos vitales, como son el cerebro y el corazón, reduciendo el flujo sanguíneo y con ello la función de algunos órganos como son los riñones o los pulmones; ayudando a reducir el consumo de oxígeno total [13, 31, 46] y permitiendo las inmersiones tan prolongadas que realizan estos animales.

Como ya hemos detallado las inmersiones voluntarias aeróbicas en *Caretta caretta* varían desde 7 minutos en animales pequeños (2-15kg) hasta 27 minutos en ejemplares más grandes (20kg) [13]. Aún así esta especie puede bucear durante periodos de más de tres horas debido a su elevada capacidad anaeróbica [13, 123].

El buceo se inicia tras la inhalación [13] siendo el pulmón el mayor reservorio de oxígeno. Aun así el acceso al oxígeno requiere que la región de intercambio gaseoso (alveolo) no esté colapsada cuando el pulmón está perfundido. A medida que la presión aumenta con la profundidad los alvéolos se comprimen causando derivaciones intrapulmonares que reducen el intercambio gaseoso [35], similar al colapso alveolar descrito en mamíferos marinos. Como consecuencia, para utilizar el oxígeno almacenado en el pulmón, las inmersiones deberían ser menos profundas que la profundidad a la que los alvéolos se colapsan y el intercambio gaseoso cesa. Las tortugas de la especie *Caretta caretta* permanecen el 90% de su tiempo a profundidades menores a 40 metros [86]. En un estudio previo en el que se introdujo a las tortugas marinas en cámaras hiperbáricas con el fin de

recrear las condiciones de presión durante el buceo se observó que durante el mismo se producía un shunt que desviaba la circulación pulmonar y estableció que el colapso alveolar se producía a profundidades mayores a 80 metros [35].

Pero los estudios indican que la mayoría de las inmersiones en *Caretta caretta* son a menor profundidad que a la que se produce el colapso alveolar. Si todo fuese como lo descrito anteriormente, en esta especie el nitrógeno se absorbería de forma constante, lo que supondría un elevado riesgo de embolia gaseosa incluso en inmersiones rutinarias. Sin embargo, ya hemos explicado que esto no sucede así y que se debe en gran medida a su capacidad de realizar shunts a nivel cardiaco.

El papel de las derivaciones cardíacas ha sido muy estudiado en tortugas de agua dulce y en una amplia variedad de reptiles [56, 61, 65, 66, 120]. Como ya hemos explicado, las derivaciones derechas-izquierdas desvían la circulación pulmonar hacia la circulación sistémica. De esta forma minimizan el intercambio gaseoso, reduciendo también la absorción de nitrógeno durante el buceo y minimizando la formación de burbujas durante el ascenso. Durante el buceo, por acción del sistema nervioso parasimpático (mediado por la acetilcolina) se produce una reducción de la frecuencia cardíaca y un aumento de la resistencia vascular pulmonar, que junto a la derivación derecha-izquierda reduce la perfusión pulmonar [62, 65, 124, 125].

La presente tesis doctoral explica un mecanismo de derivación nuevo y específico de tortugas marinas que implica la contracción de la arteria pulmonar y su esfínter cuando está bajo control parasimpático, así como la contracción del parénquima pulmonar. La oclusión completa de la luz del vaso impide la perfusión pulmonar e induce una derivación cardíaca derecho- izquierdo de tal forma que el flujo cardiaco se dirige hacia la circulación sistémica.

La activación del sistema nervioso simpático supone un aumento de la frecuencia cardíaca y del flujo sanguíneo y una reducción de la derivación derecha- izquierda, lo que implica una mayor perfusión pulmonar [56, 61, 66, 120]. Los resultados de la acción del sistema nervioso simpático sobre el esfínter de la arteria pulmonar sugieren que esta estructura desarrolla un

importante papel vasomotor condicionando la dirección del flujo sanguíneo en estas especies.

Los resultados derivados de nuestro estudio nos permiten entender que durante el buceo el animal se encuentra bajo una respuesta predominante del sistema nervioso parasimpático manteniendo el esfínter cerrado junto con una marcada bradicardia y no permitiendo la perfusión pulmonar y la subsiguiente difusión de nitrógeno, evitando así el riesgo de descompresión durante el ascenso. Los resultados obtenidos en *Caretta caretta* demuestran lo expuesto anteriormente: tanto la arteria pulmonar, su esfínter, la arteria intrapulmonar y el parénquima pulmonar muestran una respuesta claramente contráctil cuando son expuestos a acetilcolina y serotonina. En consecuencia, la liberación de acetilcolina debido al incremento del tono parasimpático, indica que la respuesta al buceo colabora en la constricción tanto de la arteria pulmonar como de su esfínter.

Sin embargo, ante un estímulo estresante y especialmente si es prolongado, el sistema nervioso simpático induciría una liberación de adrenalina, que a concentraciones elevadas supondrá la apertura del esfínter, con la consecuente perfusión pulmonar y que facilitará la absorción del nitrógeno pulmonar por difusión pasiva. En consecuencia, si una tortuga se queda atrapada en una red, el estrés y el aumento de la actividad muscular al intentar escapar eleva la respuesta simpática y con ello la liberación de adrenalina [60, 61, 69, 126]. Además, como ya hemos tratado en la introducción se ha demostrado el aumento de ácido láctico (indicador de la actividad muscular elevada) en las tortugas marinas que han sido capturadas [88, 105]. La estimulación simpática prolongada revertirá la bradicardia inducida por el buceo, aumentando el gasto cardíaco. Además, la taquicardia inducida por el estímulo simpático facilitará la rápida diseminación del nitrógeno por el torrente circulatorio. Estudios en tortugas marinas tras ser capturadas demuestran que el incremento de las catecolaminas supone un aumento de la frecuencia cardíaca y la perfusión pulmonar [21, 56, 57, 61, 63]. El tiempo atrapada en las redes y la profundidad favorecen una mayor absorción de nitrógeno disuelto en sangre que podrá transformarse en embolia gaseosa durante el ascenso a la superficie [12, 121, 127].

En resumen, el presente estudio propone que el mecanismo principal que causa la embolia gaseosa en las tortugas capturadas en las redes de pesca es el aumento del tono simpático y su consecuente liberación de catecolaminas. Esto supone la apertura del esfínter de la arteria pulmonar y con ello el fallo del mecanismo fisiológico que regula tanto la ventilación como la perfusión de los pulmones, conserva el oxígeno y minimiza la absorción de nitrógeno.

Por lo tanto, esta estructura anatómica es un rasgo diferencial conservado y relacionado con el buceo a profundidad que proporciona una estrategia para reducir los problemas relacionados con el mismo y a la vez supone un acceso selectivo a las reservas pulmonares de oxígeno cuando sea necesario.

Este trabajo proporciona una nueva e importante clave en la comprensión de la fisiopatología del síndrome descompresivo en tortugas marinas, explicando el funcionamiento normal de una estructura hasta ahora poco estudiada, el esfínter de la arteria pulmonar y su respuesta durante la captura accidental. De esta forma establece uno de los mecanismos protectores más importantes que se desestabiliza al interaccionar estas especies con las artes de pesca actuales.

Los resultados presentados proporcionan un nuevo paradigma a considerar en muchos aspectos diferentes de la investigación actual de tortugas marinas, desde aspectos fisiopatológicos básicos sobre adaptaciones de buceo, manejo y tratamiento de tortugas enfermas vivas que han quedado atrapadas accidentalmente, aspectos en diseño de estrategias y dispositivos de mitigación de impacto de captura incidental, implicaciones en las estimaciones de supervivencia para proyecciones de población o incluso aspectos tales como riesgos adicionales asociados con la investigación del trabajo de campo o arrastre de fondo en ciertas áreas para la eliminación y reubicación de tortugas marinas propuestas, cuando se requiere la captura de tortugas de buceo gratuitas.

Múltiples estudios revelan que la captura accidental en redes de pesca tiene efectos significativos en la fisiología de las tortugas marinas [104-106, 128, 129].

La investigación en otras regiones del planeta y en otras especies de tortugas marinas es de vital importancia para comprender todos los factores que pueden influir en esta enfermedad, como tipo de pesca, profundidad, área geográfica, condiciones oceánicas, especie y características individuales.

En muchos casos se han realizado encuestas a los pescadores que permiten estimar la mortalidad directa que sufren las tortugas como consecuencia de la captura. Sin embargo, también es necesaria la determinación de la mortalidad post-captura, es decir, teniendo en cuenta la probabilidad de que el animal pueda morir tras ser capturado vivo y devuelto posteriormente al mar. Pero precisamente en las estimaciones de la mortalidad posterior a la captura existe una gran brecha de conocimiento siendo estos datos esenciales para comprender mejor el impacto real que la pesca puede tener en la población de tortugas marinas y para obtener información más útil en el manejo de poblaciones [71]. En este sentido, el único método disponible son los dispositivos conocidos como PSAT tags o pop-up tags, diseñados inicialmente para el seguimiento de grandes peces pero adaptados posteriormente al estudio de la mortalidad en tortugas marinas. Se trata de unos aparatos que se colocan en el caparazón de las tortugas capturadas de forma accidental, por lo que al ser devueltas al mar se puede realizar un seguimiento durante un período determinado de tiempo. Estos aparatos se pueden programar para registrar la profundidad (m) y la temperatura (° C) cada 2 s, y el nivel de luz cada 10 s. Los datos se almacenan en partes de 14 segmentos (de profundidad y temperatura) que cubren los rangos de 0 a > 250 m (y hasta 500 m) y de 5 a > 32° C, respectivamente. Esto permite ver los patrones de inmersión de cada tortuga liberada.

Trabajos futuros estarán dirigidos a definir aún más las variables de riesgo y establecer medidas de mitigación efectivas en pesca.

Esta patología debe estar dentro de los diagnósticos diferenciales de cualquier tortuga marina que haya sido capturada por redes de pesca a profundidad y llevada a superficie de forma involuntaria. Hasta el momento, lo comprobado es que no se requieren profundidades muy elevadas para desarrollar síndrome descompresivo en estos animales puesto que hay casos reportados capturados a 10 metros de profundidad.





## **6. CONCLUSIONES**



- (1) La presente tesis doctoral explica un mecanismo de derivación cardíaca nuevo y específico de tortugas marinas que implica la contracción de la arteria pulmonar y su esfínter cuando está bajo control parasimpático, así como la contracción del parénquima pulmonar. La oclusión completa de la luz del vaso impide la perfusión pulmonar e induce una derivación cardíaca derecha- izquierda de tal forma que el flujo cardíaco se redirige hacia la circulación sistémica.
- (2) El presente estudio propone que el mecanismo principal que causa la embolia gaseosa en las tortugas capturadas en las redes de pesca es el aumento del tono simpático y su consecuente liberación de catecolaminas. Esto supone la apertura del esfínter de la arteria pulmonar y con ello el fallo del mecanismo fisiológico que protege frente a esta patología.
- (3) Los resultados presentados proporcionan un nuevo paradigma a considerar en muchos aspectos diferentes de la investigación actual de tortugas marinas, desde aspectos fisiopatológicos básicos hasta aspectos relacionados con el diseño de estrategias y dispositivos de mitigación de impacto de captura incidental.
- (4) Los resultados obtenidos no solo demuestran la importancia de continuar con los estudios en tortugas marinas sino de profundizar más en los mecanismos anatómicos y fisiológicos de las diferentes especies de mamíferos marinos al considerarse que también podrían sufrir esta patología.



## **8.BIBLIOGRAFÍA**



1. Cockett, A.T. and R.M. Nakamura, Newer Concepts in the Pathophysiology of Experimental Dysbarism--Decompression Sickness. *Am Surg*, 1964. 30: p. 447-51.
2. Hennessy, T.R. and H.V. Hempleman, An examination of the critical released gas volume concept in decompression sickness. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1977. 197(1128): p. 299-313.
3. Ehrhart, I.C., W.M. Granger, and W.F. Hofman, Effects of arterial pressure on lung capillary pressure and edema after microembolism. *J Appl Physiol* (1985), 1986. 60(1): p. 133-40.
4. Butler, B.D. and B.A. Hills, Transpulmonary passage of venous air emboli. *J Appl Physiol* (1985), 1985. 59(2): p. 543-7.
5. Butler, B.D. and J. Katz, Vascular pressures and passage of gas emboli through the pulmonary circulation. *Undersea Biomed Res*, 1988. 15(3): p. 203-9.
6. Hallenbeck, J.M., et al., Several new aspects of bubble-induced central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1984. 304(1118): p. 177-84.
7. Dembert, M.L., Long-term health consequences of diving accidents. *Undersea Biomed Res*, 1987. 14(4): p. 372-3.
8. Melamed, Y., A. Shupak, and H. Bitterman, Medical problems associated with underwater diving. *N Engl J Med*, 1992. 326(1): p. 30-5.
9. Taya, Y., [Underwater physiology (Part III)]. *Ann Physiol Anthropol*, 1985. 4(3): p. 260-6.
10. Wilmshurst, P. and P. Bryson, Relationship between the clinical features of neurological decompression illness and its causes. *Clin Sci (Lond)*, 2000. 99(1): p. 65-75.
11. Vann, R.D., et al., Decompression illness. *The Lancet*, 2011. 377(9760): p. 153-164.
12. García-Párraga, D., et al., Decompression Sickness ("the bends") in Sea Turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014. 111: p. 191-205.
13. Lutz, P.L. and B.B. Bentley, Physiology of Diving in the Sea Turtle. *Copeia*, 1985. 1985(3): p. 671-679.
14. Lutz, P.L., et al., Cerebral resistance to anoxia in the marine turtle. *Respir Physiol*, 1980. 41(3): p. 241-51.

15. Greer, A.E., J.D. Lazell, and R.M. Wright, Anatomical evidence for a counter-current heat exchanger in the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Nature*, 1973. 244(5412): p. 181-181.
16. Eckert, S.A., et al., Diving and foraging behavior of leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*). *Canadian journal of zoology*, 1989. 67(11): p. 2834-2840.
17. Plotkin, P.T., Migratory and reproductive behavior of the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), in the eastern Pacific Ocean. 1994, Texas A & M University.
18. Sakamoto, W., et al., Deep diving behavior of the loggerhead turtle near the frontal zone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1990. 56(9): p. 1435-1443.
19. Starbird, C.H., Interesting movements and behavior of hawksbill sea turtles (*Eretmochelys imbricata*) around Buck Island Reef National Monument, St. Croix, United States Virgin Islands. 1993.
20. Lutcavage, M.E., P.L. Lutz, and H. Baier, Respiratory mechanics of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Respir Physiol*, 1989. 76(1): p. 13-24.
21. West, N.H., P.J. Butler, and R.M. Bevan, Pulmonary blood flow at rest and during swimming in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Physiological zoology*, 1992. 65(2): p. 287-310.
22. Southwood, A.L., et al., Heart rates and diving behavior of leatherback sea turtles in the eastern pacific ocean. *J Exp Biol*, 1999. 202 (Pt 9): p. 1115-25.
23. Jackson, D.C., D.R. Kraus, and H.D. Prange, Ventilatory response to inspired CO<sub>2</sub> in the sea turtle: effects of body size and temperature. *Respir Physiol*, 1979. 38(1): p. 71-81.
24. Perry, S.F. and H.R. Duncker, Lung architecture volume and static mechanics in five species of lizards. *Respir Physiol*, 1978. 34(1): p. 61-81.
25. Solomon, S.E. and M. Purton, The respiratory epithelium of the lung in the green turtle (*Chelonia mydas* L.). *J Anat*, 1984. 139 ( Pt 2): p. 353-70.
26. Kooyman, G.L., Deep diving behaviour and effects of pressure in reptiles, birds, and mammals. *Symp Soc Exp Biol*, 1972. 26: p. 295-311.
27. Kooyman, G.L., et al., Blood nitrogen tensions of seals during simulated deep dives. *American Journal of Physiology*, 1972. 223(5): p. 1016-1020.



28. Leith, D.E., Comparative mammalian respiratory mechanics. *Physiologist*, 1976. 19(4): p. 485-510.
29. Milsom, W.K., B.L. Langille, and D.R. Jones, Vagal control of pulmonary vascular resistance in the turtle *Chrysemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*, 1977. 55(2): p. 359-367.
30. Hochscheid, S., F. Bentivegna, and G.C. Hays, First records of dive durations for a hibernating sea turtle. *Biol Lett*, 2005. 1(1): p. 82-6.
31. Lutcavage, M.E. and P.L. Lutz, Diving physiology. *The biology of sea turtles*, 1997. 1: p. 277-296.
32. Perez-Pinzon, M.A., et al., Anoxic survival of the isolated cerebellum of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J Comp Physiol B*, 1992. 162(1): p. 68-73.
33. Lutz, P.L., H.M. Prentice, and S.L. Milton, Is turtle longevity linked to enhanced mechanisms for surviving brain anoxia and reoxygenation? *Exp Gerontol*, 2003. 38(7): p. 797-800.
34. Hillman, S.S. and P.C. Withers, An analysis of respiratory surface area as a limit to activity metabolism in anurans. *Canadian Journal of Zoology*, 1979. 57(11): p. 2100-2105.
35. Berkson, H., Physiological adjustments to deep diving in the pacific green turtle (*Chelonia mydas agassizii*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1967. 21: p. 507-524.
36. Rothschild, B. and L.D. Martin, Avascular necrosis: occurrence in diving Cretaceous mosasaurs. *Science*, 1987. 236: p. 75.
37. Sapsford, C.W., Anatomical Evidence for Intracardiac Blood Shunting in Marine Turtles. *Zoologica Africana*, 1978. 13(1): p. 57-62.
38. Wyneken, J., *The anatomy of sea turtles 2001*, U.S. Department of Commerce. p. 172.
39. Scholander, P.F., The Master Switch of Life. *Sci Am*, 1963. 209: p. 92-106.
40. Davis, R.W. and S.B. Kanatous, Convective oxygen transport and tissue oxygen consumption in Weddell seals during aerobic dives. *Journal of Experimental Biology*, 1999. 202: p. 1091-1113.

41. Fahlman, A., et al., Deep diving mammals: Dive behavior and circulatory adjustments contribute to bends avoidance. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 2006. 153(1): p. 66-77.
42. McDonald, B.I. and P.J. Ponganis, Lung collapse in the diving sea lion: hold the nitrogen and save the oxygen. *Biology Letters*, 2012. 8(6): p. 1047-9.
43. Falke, K.J., et al., Seal lung collapse during free diving: evidence from arterial nitrogen tensions. *Science*, 1985. 229(August 9): p. 556-557.
44. Kooyman, G.L. and E.E. Sinnett, Pulmonary shunts in Harbor seals and sea lions during simulated dives to depth. *Physiological Zoology*, 1982. 55(1): p. 105-111.
45. Ridgway, S.H. and R. Howard, Dolphin lung collapse and intramuscular circulation during free diving: evidence from nitrogen washout. *Science*, 1979. 206(4423): p. 1182-1183.
46. Scholander, P.F., Experimental investigations on the respiratory function in diving mammals and birds. *Hvalrådets Skrifter*, 1940. 22: p. 1-131.
47. Bernaldo de Quirós, Y., et al., Decompression versus decomposition: distribution, quantity and gas composition of bubbles in stranded marine mammals. *Frontiers in Physiology*, 2012. 3(177): p. 1-19.
48. Fernandez, A., et al., "Gas and Fat Embolic Syndrome" Involving a Mass Stranding of Beaked Whales (Family Ziphiidae) Exposed to Anthropogenic Sonar Signals. *Veterinary Pathology*, 2005. 42: p. 446-457.
49. Moore, M.J., et al., Gas bubbles in seals, dolphins, and porpoises entangled and drowned at depth in gillnets. *Veterinary Pathology*, 2009. 46: p. 536-547.
50. Moore, M.J. and G.A. Early, Cumulative sperm whale bone damage and the bends. *Science*, 2004. 306(5705): p. 2215.
51. Lutcavage, M.E., P.L. Lutz, and H. Baier, Oxygen transport in the leatherback sea turtle *Dermochelys coriacea*. *Physiological Zoology*, 1990. 63(5): p. 1012-1024.
52. Wood, S.C. and C.J. Lenfant, Respiration: mechanics, control and gas exchange. *Biology of the Reptilia*, 1976. 5: p. 225-274.
53. Wyneken, J., K.J. Lohmann, and J.A. Musick, *The Biology of Sea Turtles*. Vol. 3. 2013: CRC Press.
54. Garcia-Parraga, D., et al., Cardiovascular System, in *Sea Turtle Health and Rehabilitation*, C.A. Manire, et al., Editors. 2017. p. 295-320.

55. Gamperl, A.K., et al., Cardiorespiratory responses of the toad (*Bufo marinus*) to hypoxia at two different temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 1999. 202(24): p. 3647-3658.
56. Wang, T., et al., Vagal control of heart rate and cardiac shunts in reptiles: Relation to metabolic state. *Experimental Physiology*, 2001. 86(6): p. 777-784.
57. White, F.N. and G. Ross, Circulatory changes during experimental diving in the turtle. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 1966. 211(1): p. 15-18.
58. Hicks, J.W., et al., The mechanism of cardiac shunting in reptiles: A new synthesis. *Journal of Experimental Biology*, 1996. 199: p. 1435-1446.
59. Hicks, J.W. and T. Wang, Functional role of cardiac shunts in reptiles. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 1996. 275(2-3): p. 204-216.
60. Hicks, J. and S. Comeau, Vagal regulation of intracardiac shunting in the turtle *Pseudemys scripta*. *Journal of Experimental Biology*, 1994. 186(1): p. 109-126.
61. Shelton, G. and W. Burggren, Cardiovascular dynamics of the chelonia during apnoea and lung ventilation. *Journal of Experimental Biology*, 1976. 64(2): p. 323-343.
62. Burggren, W.W. and G. Shelton, Gas Exchange and Transport During Intermittent Breathing in Chelonian Reptiles. *The Journal of Experimental Biology*, 1979. 82(1): p. 75-92.
63. Wang, T. and J. Hicks, Cardiorespiratory synchrony in turtles. *Journal of Experimental Biology*, 1996. 199(8): p. 1791-1800.
64. Wang, T. and J.W. Hicks, The interaction of pulmonary ventilation and the right-left shunt on arterial oxygen levels. *Journal of Experimental Biology*, 1996. 199(10): p. 2121-2129.
65. Wang, T. and J.W. Hicks, Cardiorespiratory synchrony in turtles. *Journal of Experimental Biology*, 1996. 199(8): p. 1791-1800.
66. Wang, T., H.K. Egle, and J.W. Hicks, The Role of Cardiac Shunts in the Regulation of Arterial Blood Gases. *American Zoologist*, 1997. 37(1): p. 12-22.
67. Zaar, M., et al., Contractile properties of the functionally divided python heart: two sides of the same matter. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007. 146(2): p. 163-73.

68. Ootsuka, Y. and M. Tanaka, Control of cutaneous blood flow by central nervous system. *Temperature (Austin)*, 2015. 2(3): p. 392-405.
69. Overgaard, J., et al., Adrenergic control of the cardiovascular system in the turtle *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Biology*, 2002. 205: p. 3335-3345.
70. Cox, T.M., et al., Comparing effectiveness of experimental and implemented bycatch reduction measures: the ideal and the real. *Conserv Biol*, 2007. 21(5): p. 1155-64.
71. Lewison, R., et al., Fisheries bycatch of marine turtles: lessons learned from decades of research and conservation. *The biology of sea turtles*, 2013. 3: p. 329-351.
72. Lewison, R.L. and L.B. Crowder, Putting longline bycatch of sea turtles into perspective. *Conserv Biol*, 2007. 21(1): p. 79-86.
73. Wallace, B.P., et al., Regional management units for marine turtles: a novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e15465.
74. Wallace, B.P., et al., Global patterns of marine turtle bycatch. *Conservation letters*, 2010. 3(3): p. 131-142.
75. Pauly, D., et al., Fishing down marine food webs. *Science*, 1998. 279(5352): p. 860-3.
76. Jackson, J.B., et al., Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science*, 2001. 293(5530): p. 629-37.
77. Dayton, P.K., S.F. Thrush, and R.J. Hofman, Viewpoint: Environmental effects of marine fishing. *aquatic conservation marine freshwater ecosystems*, 1995. 5: p. 205-232.
78. Soykan, C.U., Why study bycatch? endangered species research, 2008. 5: p. 91-102.
79. Hall, M.A., D.L. Alverson, and K.L. Metzuzals, By-catch: problems and solutions. *marine pollution bulletin*, 2000. 41: p. 204-219.
80. Bjorndal, K.A., et al., Ecology. Better science needed for restoration in the Gulf of Mexico. *Science*, 2011. 331(6017): p. 537-8.
81. Fujiwara, M. and H. Caswell, Demography of the endangered North Atlantic right whale. *Nature*, 2001. 414(6863): p. 537-41.
82. Lewison, R.L., et al., Global patterns of marine mammal, seabird, and sea turtle bycatch reveal taxa-specific and cumulative megafauna hotspots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. 111(14): p. 5271-6.
83. Spotilla, *Sea turtles*. 2004, John Hopkins University

84. Peckham, S.H., et al., Small-scale fisheries bycatch jeopardizes endangered Pacific loggerhead turtles. *PLoS One*, 2007. 2(10): p. e1041.
85. Wallace, B.P., et al., Global conservation priorities for marine turtles. *PLoS one*, 2011. 6(9): p. e24510.
86. Polovina, J.J., et al., Forage and migration habitat of loggerhead (*Caretta caretta*) and olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtles in the central North Pacific Ocean. *Fisheries Oceanography*, 2004. 13(1): p. 36-51.
87. Hochscheid, S., et al., Allometric scaling of lung volume and its consequences for marine turtle diving performance. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007. 148(2): p. 360-7.
88. Stabenau, E.K., T.A. Heming, and J.F. Mitchell, Respiratory, acid-base and ionic status of Kemp's Ridley sea-turtles (*Lepidochelys kempi*) subjected to trawling. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 1991. 99: p. 107-111.
89. Komoroske, L.M. and R.L. Lewison, Addressing fisheries bycatch in a changing world. *Frontiers in Marine Science*, 2015. 2: p. 83.
90. Shamblin, B.M., et al., Geographic patterns of genetic variation in a broadly distributed marine vertebrate: new insights into loggerhead turtle stock structure from expanded mitochondrial DNA sequences. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e85956.
91. Casale, P., *Sea turtles in the Mediterranean: distribution, threats and conservation priorities*. . 2010, IUCN.
92. Casale, P., et al., Sea turtle strandings reveal high anthropogenic mortality in Italian waters. *Aquatic conservation* 2010. 20: p. 611-620.
93. Chaloupka, M., et al., Causespecific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982–2003). *marine biology*, 2008. 154: p. 887-898.
94. Mangel, J.C., et al., Post-capture movements of loggerhead turtles in the southeastern Pacific Ocean assessed by satellite tracking. *Marine Ecology Progress Series*, 2011. 433: p. 261-272.
95. Casale, P., *Sea turtle bycatch in the Mediterranean*. . *Fish and Fisheries*, 2010. 12: p. 299-316.

96. Álvarez de Quevedo, I., et al., Sources of bycatch of loggerhead sea turtles in the western Mediterranean other than drifting longlines. *ICES Journal of Marine Science*, 2009. 67(4): p. 677-685.
97. Cardona, L., et al., Western Mediterranean immature loggerhead turtles: habitat use in spring and summer assessed through satellite tracking and aerial surveys. *marine biology*, 2005. 147: p. 583-591.
98. Carreras, C., L. Cardona, and A. Aguilar, Incidental catch of the loggerhead turtle *Caretta caretta* off the Balearic Islands (western Mediterranean). *. biology conservation*, 2004. 117: p. 321-329.
99. Báez, J.C., J.A. Camiñas, and L. Rueda, Incidental capture of marine turtles in marine fisheries of southern Spain. *marine turtle newsletter*, 2006. 111: p. 11-12.
100. Báez, J.C., R. Real, and J.A. Camiñas, Loggerhead turtle by-catch depends on distance to the coast, independent of fishing effort: implications for conservation and fisheries management. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 2007. 87: p. 801-803.
101. Báez, J.C., et al., Loggerhead turtle by-catch depends on distance to the coast, independent of fishing effort: implications for conservation and fisheries management. *Marine Ecology Progress Series* 2007. 338: p. 249-256.
102. Doménech, F., et al., Incidental catch of marine turtles by Spanish bottom trawlers in the western Mediterranean. *aquatic conservation marine freshwater ecosystems*, 2015. 25: p. 678-689.
103. Cardona, L., et al., Habitat use by loggerhead sea turtles *Caretta caretta* off the coast of eastern Spain results in a high vulnerability to neritic fishing gear. *marine biology*, 2009. 156: p. 2621-2630.
104. Harms, C.A., et al., Venous blood gases and lactates of wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) following two capture techniques. *Journal of Wildlife Diseases*, 2003. 39: p. 366-374.
105. Stabenau, E.K. and K.R.N. Vietti, The physiological effects of multiple forced submergences in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Fishery Bulletin*, 2003. 101(4): p. 889-899.

106. Snoddy, J.E., et al., Blood Biochemistry of Sea Turtles Captured in Gillnets in the Lower Cape Fear River, North Carolina, USA. *The Journal of Wildlife Management*, 2009. 73(8): p. 1394-1401.
107. Epperly, S., Fisheries-related mortality and turtle excluder devices (TEDs). *The biology of sea turtles*, 2003. 2: p. 339-353.
108. Southwood, A., Physiology as integrated systems. *The biology of sea turtles*, 2013. 3: p. 1-30.
109. Wang, J., et al., Developing ultraviolet illumination of gillnets as a method to reduce sea turtle bycatch. *Biology letters*, 2013. 9(5): p. 201.
110. Ellis, P. and E. Muller-Schweinitzer, Maintenance of functional activity of human pulmonary arteries after cryopreservation. *Br J Pharmacol*, 1991. 103(2): p. 1377-80.
111. Muller-Schweinitzer, E., Cryopreservation: a useful technique for storing tissues for pharmacological investigations. *Trends Pharmacol Sci*, 1988. 9(6): p. 221-3.
112. Muller-Schweinitzer, E., J. Hasse, and L. Swoboda, Cryopreservation of human bronchi. *J Asthma*, 1993. 30(6): p. 451-7.
113. Muller-Schweinitzer, E. and C. Tapparelli, Pharmacological studies on frozen stored canine saphenous veins and basilar arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1986. 332(1): p. 74-8.
114. Muller-Schweinitzer, E., C. Tapparelli, and M. Victorzon, Functional studies on human veins after storage at -190 degrees C. *Br J Pharmacol*, 1986. 88(3): p. 685-7.
115. Wyneken, J., Anatomy of the leatherback turtle. *The Leatherback Turtle: Biology and Conservation*, 2015: p. 32-48.
116. Van Nueten, J.M., W.J. Janssens, and P.M. Vanhoutte, Serotonin and vascular reactivity. *Pharmacological Research Communications*, 1985. 17(7): p. 585-608.
117. Furchgott, R.F. and S. Bhadrakom, Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1953. 108(2): p. 129-143.
118. Goldie, R.G., J.W. Paterson, and J.L. Wale, Pharmacological responses of human and porcine lung parenchyma, bronchus, and pulmonary artery *British Journal of Pharmacology*, 1982. 76(4): p. 515-521.

119. Cortijo, J., et al., Characterization of 5-HT receptors on human pulmonary artery and vein: functional and binding studies. *British Journal of Pharmacology*, 1997. 122: p. 1455-1463.
120. Burggren, W., The pulmonary circulation of the chelonian reptile: morphology, haemodynamics and pharmacology. *Journal of Comparative Physiology*, 1977. 116(3): p. 303-323.
121. Fahlman, A., et al., Defining risk variables causing gas embolism in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) caught in trawls and gillnets. *Scientific Reports*, 2017. 7: p. 2739.
122. Bert, P., *Lecons sur la physiologie comparee de la respiration*. 1870.
123. Berkson, H., Physiological adjustments to prolonged diving in the Pacific Greent turtle (*Chelonia mydas agassizii*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1966. 18: p. 101-119.
124. Hicks, J.W., Cardiac shunting in reptiles: mechanisms, regulation and physiological functions, in *Biology of Reptilia, Morphology G, Visceral Organs*, C. Gans and A.S. Gaunt, Editors. 1998, SSAR Press: Ithaca, NY. p. 425-483.
125. Yeates, L.C., et al., Nitric oxide in the breath of bottlenose dolphins: Effects of breath hold duration, feeding, and lung disease. *Marine Mammal Science*, 2014. 30(1): p. 272-281.
126. Comeau, S.G. and J.W. Hicks, Regulation of central vascular blood flow in the turtle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1994. 276(2): p. R569-R578.
127. Fahlman, A., Allometric scaling of decompression sickness risk in terrestrial mammals; cardiac output explains risk of decompression sickness. *Scientific Reports*, 2017. 7(40918): p. 1-9.
128. Lutz, P.L. and A. Dunbar-Cooper, Variations in the blood-chemistry of the loggerhead sea-turtle, *Caretta caretta*. *Fishery Bulletin*, 1987. 85: p. 37-43.
129. Snoddy, J.E. and A. Southwood Williard, Movements and post-release mortality of juvenile sea turtles released from gillnets in the lower Cape Fear River, North Carolina, USA. *Endangered Species Research*, 2010. 12: p. 235-247.



## **9. ÍNDICE ABREVIATURAS**



5HT: Serotonina

ACC: Ancho del caparazón en curvo

ACC: Arteria carótida común

Ach: Acetilcolina

ATP: Adenosín trifosfato.

BCT: Tronco braquiocefálico

Br: Arteria braquial

BSA: Albúmina sérica bovina

CA: cavum arteriosum

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de calcio

CC: *Caretta caretta*

Ce: Arteria celíaca

CK: Creatín quinasa

Cl<sub>2</sub>Mg: Cloruro de magnesio

Co: Arteria costal

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CV: Cavum pulmonale

DAo: Arteria aorta dorsal

DEPC: Agua dietilpirocarbonato

Di: Arteria digital

DMEM: Medio dulbecco's modified eagle

DMSO: Dimetil sulfóxido

DV: Dorso- ventral

EDTA: Ácido estilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etilenglicol tetraacético

E<sub>max</sub>: Efecto máximo

Es: Arteria esofágica

ExI: Arteria iliaca externa  
Fe: Arteria femoral  
Ga: Arteria gástrica  
HCl: Ácido Clorhídrico  
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1piperazino etanosulfónico  
InI: Arteria iliaca interna  
KCl: Cloruro potásico  
KHPO<sub>4</sub>: Bifosfato potásico  
LA: Aurícula izquierda  
LAo: Arteria aorta izquierda  
LCC: Longitud del caparazón en curvo  
L-L: Latero- lateral  
LPa: Arteria pulmonar izquierda  
L-R: Derivaciones izquierdo - derechas  
MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnesio  
N<sub>2</sub>: Nitrógeno  
NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato sódico  
PBS: Tampón salino sulfato  
pCO<sub>2</sub>: Presión parcial de dióxido de carbono  
pD<sub>2</sub>: Potencia del fármaco  
PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride  
PS: Esfínter pulmonar  
PVDF: Polifluoruro de vinilideno  
RA: Aurícula derecha  
RAo: Aorta derecha  
R-L: Derivaciones derecho – izquierdas  
RMN: Resonancia magnética

RMUs: Unidades de gestión regional

RPA: Arteria pulmonar derecha

SDS: Dodecilsulfato sódico

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

TAC: Tomografía axial computerizada

TEDs: Sistemas de exclusión de tortugas marinas

TEMED: Tetramethylethylenediamine para electrophoresis

V: Ventrículo