



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN PINNÍPEDOS

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

José Pablo Vázquez Medina

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2007.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 05 del Mes de Octubre del 2007, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Defensas antioxidantes en pinnípedos"

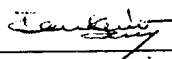
Presentada por el alumno:

José Pablo Vázquez Medina

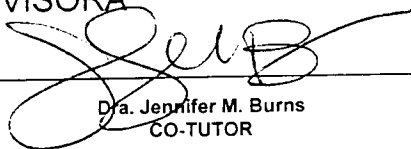
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología Marina

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

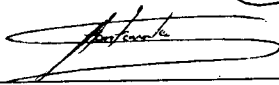
LA COMISION REVISORA




Dra. Tania Zenteno Savin
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Jennifer M. Burns
CO-TUTOR



Dr. Abel Santamaria del Ángel
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Jennifer M. Burns (University of Alaska, Anchorage)

Dr. Abel Santamaría del Ángel (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía)

Dra. Tania Zenteno Savín (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC)

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Jennifer M. Burns (UAA)

Dr. Abel Santamaría del Ángel (INNyN)

Dra. Tania Zenteno Savín (CIBNOR)

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Jennifer M. Burns (UAA)

Dr. Abel Santamaría del Ángel (INNyN)

Dra. Tania Zenteno Savín (CIBNOR)

Suplente: Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle (CIBNOR)

Resumen

Los ajustes cardiovasculares que permiten a los pinnípedos bucear provocan ciclos continuos de isquemia/reperfusión durante y después de un buceo. La isquemia/reperfusión es una patología que en mamíferos terrestres conlleva la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el daño oxidativo. Estudios previos sugieren que antioxidantes enzimáticos ayudan a los pinnípedos a contrarrestar la producción de ERO derivada del buceo evitando el daño oxidativo. A la fecha no existe evidencia de la participación de antioxidantes no enzimáticos contra la producción de ERO derivada de la respuesta al buceo. En la primera parte de este trabajo se estudió la participación del sistema del glutatión (GSH) como mecanismo de defensa antioxidante contra la isquemia/reperfusión asociada al buceo. Los resultados sugieren que la disponibilidad y el reciclamiento del GSH en tejidos de foca contribuyen de manera importante a contrarrestar la producción post-buceo de ERO y atenúan el daño oxidativo. Por otra parte, se sabe que la intensidad de la isquemia durante un buceo depende de la duración del mismo y que algunas especies de pinnípedos son capaces de realizar buceos más largos y profundos que otras. En la segunda parte de este estudio se comparó la capacidad tisular para producir ERO, el daño oxidativo, la actividad enzimática antioxidante y la concentración de GSH entre tejidos de tres especies de pinnípedos con capacidades fisiológicas de buceo distintas. Los resultados indican que la capacidad tisular para producir ERO está estrechamente relacionada con la capacidad fisiológica de buceo y que las tres especies estudiadas están eficientemente preparadas para tolerar la isquemia/reperfusión asociada al buceo. Aunado a lo anterior, los resultados sugieren la posibilidad de que los mecanismos adaptativos que permiten a focas y lobos marinos tolerar ciclos continuos de isquemia/reperfusión derivados de la respuesta

al buceo sean distintos y dependan de las implicaciones metabólicas asociadas a la capacidad para bucear que tiene cada especie.

Vo. Bo. Dra. Tania Zenteno Savín

Directora de tesis

Abstract

Cardiovascular adjustments that allow pinnipeds to perform long and deep dives result on repetitive cycles of ischemia/reperfusion during and after diving. Ischemia/reperfusion is a pathology that in terrestrial mammals induces ROS production and oxidative damage. Previous studies suggest that enzymatic antioxidants help pinnipeds to counteract dive-derived ROS production and to avoid oxidative damage. Until now, no evidence of a role of non enzymatic antioxidants in counteracting dive-associated ROS production is available. In the first chapter of this work we studied the participation of the glutathione (GSH) system in counteracting dive-derived ROS production by comparing GSH content, oxidative damage, and the activity of the enzymes that participate in GSH recycling and maintenance between seal and pig tissues. Results suggest that GSH availability and recycling are important antioxidant mechanisms for counteracting post-diving ROS production and to avoid oxidative damage. On the other hand, it is known that the intensity of ischemia during diving depends mainly on dive duration and that, in general, phocid seals are capable of performing longer dives than sea lions. In order to address how different pinniped species are prepared to tolerate dive-derived ischemia/reperfusion we compared, in the second part of this study, the capacity to produce ROS, oxidative damage, antioxidant enzymes activity and GSH content among hooded seal, harp seal and California sea lion tissue samples. Results suggest that tissue capacity to produce ROS is strongly related to physiological diving capacity of the studied species, and that all the studied species have highly developed antioxidant systems and are well prepared to tolerate post-diving ROS production. Additionally, a possible difference in the adaptation mechanisms that contribute to counteract dive-associated ischemia/reperfusion between seals and sea lions is suggested.

A mis papas y a mis hermanos

A Liza e Ian Pablo

Agradecimientos

El presente trabajo estuvo financiando por fondos obtenidos a partir de proyectos otorgados por SEMARNAT-CONACYT, ONR, UAF y CIBNOR a la Dra. Tania Zenteno Savín. CONACYT proporcionó una beca para estudios de maestría a JPVM (200974).

El Programa de Estudios de Posgrado del CIBNOR brindó apoyo para asistir al curso “International Free Radical Summer School 2006” en Spetses, Grecia; para realizar una estancia de Investigación en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNyN) en la ciudad de México; para la impresión de la tesis y para el traslado del comité tutorial al examen de grado, además de otorgar una beca complementaria para finalizar los estudios de maestría.

El Dr. Abel Santamaría del Ángel (INNyN) y la Dra. Mina Konigsberg (UAM-I) proporcionaron reactivos y asesoría durante la visita a sus laboratorios. El Dr. del Ángel proporcionó además hospedaje durante esa estancia. Verónica Pérez (INNyN) y Armando Luna (UAM-I) brindaron asesoría y apoyo técnico en sus laboratorios.

La colecta de muestras de foca anillada se realizó con la colaboración del North Slope Borough, Alaska Department of Wildlife Science, del Dr. Robert Elsner (UAF) y de los cazadores de subsistencia Inupiat de Barrow, AK. Las muestras de cerdo se obtuvieron con la colaboración del personal del Rastro Municipal de La Paz, BCS, y del Dr. José María Acosta (SSA). Las muestras de foca de casco y de foca de harpa se colectaron con la colaboración de la Guardia Costera Canadiense y de los Drs. Michael O. Hammill (DFO, Canadá) y Jennifer M. Burns (UAA). Las muestras de lobo marino fueron obtenidas con ayuda de Norma Olguin (CIBNOR), Marisol Medina (UAM-I), Orlando Lugo (CIBNOR), Nadia Cantú (CIBNOR) y Víctor y Vladimir de la Toba. Todas las muestras fueron

colectadas e importadas a México siguiendo los lineamientos de los permisos correspondientes.

Norma Olguín y Delia Rojas (CIBNOR) brindaron asesoría y apoyo técnico en los análisis bioquímicos que fueron realizados en los laboratorios de Ecología Química Toxicológica y Bioquímica Fisiológica del CIBNOR.

Gabriela Ramos, Daniel Prado, Orlando Furtado y todos los integrantes del laboratorio del Dr. Marcelo Hermes-Lima (UBr) brindaron asesoría y asistencia para montar las técnicas bioquímicas.

El personal del Programa de Estudios de Posgrado del CIBNOR (Dra. Thelma Castellanos, Osvelia Ibarra, Leticia González, Lupita Sánchez, Claudia Olachea, Bety Gálvez, Horacio Sandoval y Manuel Melero) colaboró y brindó asesoría y apoyo técnico durante todo el tiempo de estudios. También el personal de Biblioteca, Administración y Talleres ayudaron a que este trabajo se realizara.

De manera personal quiero darle las gracias al grupo de estrés oxidativo del CIBNOR: Tania Zenteno, Juan Carlos Pérez, Norma Olguín, Roberto López, Nadia Cantú, Erick Báez, Paola Tenorio, Juan Larrinaga, Rogelio Serrano, Melania López, Dwight Arrieche, Orlando Martínez, Orlando Lugo, Nelly Tremblay, Vanesa Labrada y Citlali Guerra, por su agradable compañía, su ayuda en el laboratorio y sus comentarios. Quiero darle las gracias también a todos mis compañeros de la maestría.

Gracias a mi comité tutorial. Gracias Tania por creer en mí y en mi trabajo, por tu confianza, por tu apoyo incondicional, por animarte otra vez a dirigir mi tesis, por todas tus enseñanzas no solo en el ámbito académico y en la investigación sino también a nivel ético, moral y personal, pero sobre todo gracias por ser mi amiga. Gracias Abel por haber formado parte de este proceso, por tu hospitalidad, tus comentarios, tus enseñanzas y por

hacer todo lo posible para venir a mi examen. Thank you Jenn for the samples, the advice and for believe in my work. Thank you Dr. Elsner for your comments, corrections and ideas.

Gracias papás por todo su cariño, por su apoyo moral y económico y por estar siempre cerca de mí a pesar de la distancia. Gracias también Dr. Pablo Vázquez por haber revisado mi documento y por compartir toda tu sabiduría conmigo. Gracias Mami por tus consejos y regaños, por apoyarme en todos mis proyectos, por ayudarme a cuidar a Ian y por querernos tanto. Gracias Oli por tu ejemplo y tu cariño y gracias también por entrarle a revisar mis documentos y por ayudarme a traducir mis manuscritos al inglés aun cuando tuvieran palabras como “foca de casco” (pues si..!). Gracias hermano por tu eterna alegría, por tus consejos, por tu compañía y ¡por tus deliciosos platillos! Mucha suerte con tu maestría por aquellas tierras catalanas.

Gracias Liza por compartir tu vida conmigo, por aguantarme en los momentos difíciles, por cuidarme (con todas sus implicaciones como hacer de comer, lavar la ropa, limpiar la casa, etc.), por preocuparte por mí, por echarme porras, por creer en mí y sobre todo por quererme tanto. Tú sabes mi vida que tu amor fue una parte fundamental para que pudiera terminar este trabajo. Gracias también por echarle ganas para realizar nuestro lindo sueño. Gracias Ian porque aunque estás muy chiquito, tu llegada cambió mi vida y te convertiste en mi fuente de inspiración y en el eje central de todos mis proyectos.

Por último, y para no perder la tradición familiar, aunque sea políticamente incorrecto (note Dr. Siqueiros que he aprendido algo en sus clases de Filosofía de la Ciencia y que aun así, argumentando el paso de la etapa ética a la filosófica, tomé la decisión de escribir estas líneas), quiero darle las gracias a Everardo, Octaviano, Dingo, Dingo Blanco y Johnny Dingo.

Contenido

Lista de figuras	I
Lista de tablas	II
Lista de abreviaturas	III
Glosario	V
1. Introducción	1
2. Antecedentes	8
3. Capítulo I: Participación del sistema del glutatión como mecanismo de defensa contra la isquemia/reperfusión asociada al buceo en tejidos de foca anillada	10
3.1 Justificación	10
3.2 Objetivo general	11
3.3 Objetivos específicos	11
3.4 Hipótesis	11
3.5 Material y métodos	12
3.5.1 Obtención de muestras	12
3.5.2 Reactivos	12
3.5.3 Glutatión y glutatión disulfuro	13
3.5.4 Actividad enzimática	14
3.5.4.1 Extractos tisulares	14
3.5.4.2 Glutatión disulfuro reductasa	14
3.5.4.3 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	15
3.5.5 Daño oxidativo	15
3.5.5.1 Peroxidación de lípidos	15

3.5.5.2 Proteínas carboniladas	16
3.5.6 Proteínas solubles	17
3.5.7 Análisis estadísticos	17
3.6 Resultados	17
3.6.1 Glutación y glutación disulfuro	17
3.6.2 Actividad enzimática	20
3.6.3 Daño oxidativo	21
3.7 Discusión	22
3.8 Conclusiones	30
4. Capítulo II: Producción de radical superóxido, daño oxidativo y defensas antioxidantes en tejidos de focas y lobos marinos	31
4.1 Justificación	31
4.2 Objetivo General	31
4.3 Objetivos específicos	32
4.4 Hipótesis	32
4.5 Material y Métodos	33
4.5.1 Obtención de Muestras	33
4.5.2 Reactivos	34
4.5.3 Producción de radical superóxido	34
4.5.4 Daño oxidativo	35
4.5.4.1 Peroxidación de lípidos	35
4.5.4.2 Proteínas carboniladas	35
4.5.5 Enzimas antioxidantes	35
4.5.5.1 Extractos tisulares	35

4.5.5.2 Superóxido dismutasa	35
4.5.5.3 Catalasa	36
4.5.5.4 Glutación peroxidasa	36
4.5.5.5 Glutación-S-transferasa	37
4.5.5.6 Glutación disulfuro reductasa	37
4.5.6 Glutación y glutación disulfuro	37
4.5.7 Proteínas solubles	38
4.5.8 Análisis estadísticos	38
4.6 Resultados	39
4.6.1 Producción de radical superóxido	39
4.6.2 Daño oxidativo	39
4.6.3 Enzimas antioxidantes	41
4.6.4 Glutación y glutación disulfuro	44
4.7 Discusión	45
4.8 Conclusiones	59
5 Perspectivas	60
6 Referencias	61

Lista de figuras

- Figura 1. Contenido total de glutatión y estado de oxidación celular en tejidos de cerdo común y foca anillada. 19
- Figura 2. Actividad de glutatión disulfuro reductasa y de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en tejidos de cerdo común y foca anillada. 20
- Figura 3. Peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas en tejidos de cerdo común y foca anillada. 22
- Figura 4. Producción de radical superóxido en tejidos de foca de casco, foca de arpa y lobo marino de California. 39
- Figura 5. Peroxidación de lípidos y proteínas carboniladas en tejidos de foca de casco, foca de arpa y lobo marino de California. 40
- Figura 6. Actividad de superóxido dismutasa y catalasa en tejidos de foca de casco, foca de arpa y lobo marino de California. 42
- Figura 7. Actividad de glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa y glutatión disulfuro reductasa en tejidos de foca de casco, foca de arpa y lobo marino de California. 43
- Figura 8. Contenido total de glutatión y estado de oxidación celular en tejidos de foca de casco, foca de arpa y lobo marino de California. 44

Lista de tablas

- Tabla I. Concentraciones de glutatión total, glutatión y glutatión disulfuro, y estado de oxidación celular en tejidos de foca anillada y cerdo común. 18
- Tabla II. Actividad de glutatión disulfuro reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y marcadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas en tejidos de foca anillada. 21
- Tabla III. Concentración de glutatión y glutatión disulfuro en tejidos de foca de casco, foca de arpa y lobo marino de California. 45
- Tabla IV. Capacidad fisiológica de buceo y capacidad tisular para producir ERO de la foca de casco, la foca de arpa y el lobo marino de California. 46

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxiribonucleico

AOX: capacidad antioxidante total

ATP: adenosin trifosfato

CAT: catalasa

CO₂: dióxido de carbono

Cu,Zn-SOD: superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

EC-SOD: superóxido dismutasa extracelular

ERO: especies reactivas de oxígeno

GSH: glutatión

GSH-Eq: glutatión total

GSSG: glutatión disulfuro

GR: glutatión disulfuro reductasa

GPx: glutatión peroxidasa

GST: glutatión-S-transferasa

G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

HGPRT: hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa

HIF-1: factor inducible por hipoxia 1

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 α

HIF-1 β : factor inducible por hipoxia 1 β

HO[•]: radical oxhidrilo

Hsf: factor de choque térmico

HSPs: proteínas de choque térmico

HX: hipoxantina

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

4HNE: 4-hidroxinonenal

IMP: inosín monofosfato

MDA: malondialdehído

NADP⁺: nicotinamin adenin dinucleótido fosforilado

NADPH: nicotinamin adenín dinucleótido fosforilado reducido

NO[•]: óxido nítrico

Mn-SOD: superóxido dismutasa dependiente de manganeso

O₂: oxígeno molecular

O₂^{•-}: radical superóxido

O[↑]: oxígeno singulete

SOD: superóxido dismutasa

PO₂: presión parcial de oxígeno

pVHL: proteína de von Hippel–Lindau

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobartibúrico

TBO₂: concentraciones totales de oxígeno corporal

XDH: xantina deshidrogenasa

XO: xantina oxidasa

Glosario

Acidosis: acumulación de iones H^+ .

Actividad enzimática: velocidad con la que una enzima transforma su sustrato en un producto.

Antioxidantes: moléculas que evitan la formación de oxidantes y/o previenen, detienen o reparan el daño producido por éstos.

Apnea: suspensión de la ventilación pulmonar.

Asfixia: conjunción de hipoxia, hipercapnia y acidosis.

Bradycardia: disminución del ritmo cardíaco.

Capacidad fisiológica de buceo: variable determinada por la concentración total de oxígeno corporal que a determina el tiempo que una especie puede permanecer buceando.

Daño oxidativo: trastorno celular ocasionado por especies reactivas de oxígeno que se ve reflejado en la oxidación de biomoléculas y puede llegar a producir muerte o pérdida de la función celular.

Especies reactivas de oxígeno: radicales libres de oxígeno y sus intermediarios que pueden reaccionar de manera adversa con lípidos, proteínas o ácidos nucleicos ocasionando daño oxidativo.

Estado de óxido-reducción celular: relación entre los metabolitos oxidados y los reducidos en el interior de una célula.

Estrés oxidativo: condición fisiopatológica originada cuando la producción de especies reactivas de oxígeno es más alta que la descomposición de las mismas.

Hipercapnia: incremento en la concentración de dióxido de carbono.

Hipoxia: disminución de la concentración de oxígeno.

Isquemia: disminución del flujo de sangre oxigenada.

Peroxidación lipídica: incorporación de oxígeno a lípidos insaturados.

Proteínas carboniladas: derivados proteicos oxidados que se forman de manera irreversible por la interacción de proteínas con ERO o con aldehídos procedentes de la lipoperoxidación o de la oxidación de carbohidratos.

Radicales libres: moléculas de existencia independiente con uno o más electrones desapareados en su último nivel de energía.

Reservas totales de oxígeno corporal: cantidad total de oxígeno presente en la sangre y en los tejidos.

Respuesta al buceo: ajustes cardiovasculares (bradicardia y vasoconstricción periférica) generados a partir del inicio de una apnea.

Reoxigenación: reintroducción de oxígeno.

Reperusión: reestablecimiento del flujo de sangre oxigenada.

1. Introducción

Los pinnípedos (Carnivora: Pinnipedia) son un grupo de mamíferos marinos clasificados en dos superfamilias: Phocoidea y Otarioidea. La superfamilia Phocoidea está compuesta por la familia Phocidae, mientras que la superfamilia Otarioidea, por las familias Odobenidae y Otariidae (Reynolds et al. 1999).

La familia Odobenidae es monoespecífica, su representante, *Odobenus rosmarus* (la morsa), tiene dos variedades: atlántica y pacífica. La familia Otariidae está compuesta las subfamilias Arctocephalinae y Otariinae. Los géneros que integran a la subfamilia Arctocephalinae (lobos finos) son *Arctocephalus* (lobos finos de Guadalupe, de Juan Fernández, Sudamericano, Neozelandés, Antártico, Subantártico y del Cabo) y *Callorhinus* (lobo fino del Norte). Los géneros que integran a la subfamilia Otariinae (lobos marinos) son *Phocartos* (lobo marino de Nueva Zelanda), *Neophoca* (lobo marino Australiano), *Otaria* (lobo marino del Sur), *Zalophus* (lobo marino de California, de Galápagos y Japonés) y *Eumetopias* (lobo marino de Steller) (King 1983, Riedman 1990).

La familia Phocidae se divide en las subfamilias Monachinae (focas del sur) y Phocinae (focas del norte). La subfamilia Monachinae tiene tres grupos: 1) el del género *Mirounga* (elefantes marinos), 2) el del género *Monachus* (focas monje) y 3) el de las focas antárticas, que incluye a los géneros *Leptonychotes* (foca de Wedell), *Ommatophoca* (foca de Ross), *Lobodon* (foca Cangrejera) e *Hydrurga* (foca Leopardo). La subfamilia Phocinae también está compuesta por tres grupos: 1) Cystophorini, que es exclusivo para el género *Cystophora* (foca de casco), 2) Erignathini, que es exclusivo para el género *Erignathus* (foca barbada) y 3) Phocini, que presenta dos géneros: *Phoca* (focas anillada, común, de arpa, de listón y de Larga) y *Halichoerus* (foca gris) (Riedman 1990).

Todos los pinnípedos necesitan bucear para alimentarse y para escapar de sus depredadores. Durante el buceo, los pinnípedos experimentan asfixia progresiva, es decir, la conjunción de hipoxia (disminución de la concentración de O_2), hipercapnia (incremento en la concentración de CO_2) y acidosis (acumulación de iones hidrógeno) (Elsner y Gooden 1983). Debido a ésto, los pinnípedos tienen que resolver el problema de bucear con concentraciones limitadas de oxígeno y evitar exceder el metabolismo aerobio para no intoxicarse con concentraciones altas de lactato y CO_2 (Kooyman y Ponganis 1998, Elsner 1999, Davies y Kanatous 1999).

Las adaptaciones fisiológicas que permiten a los pinnípedos bucear con concentraciones limitadas de O_2 , usando al máximo sus reservas totales de oxígeno corporal (TBO_2), incluyen contenidos altos de hemoglobina y mioglobina, así como densidades mitocondriales y volúmenes sanguíneos elevados (Kooyman y Ponganis 1998, Kanatous et al. 1999, Elsner 1999, Kanatous et al. 2002). Los ajustes del sistema cardiorrespiratorio, que se conocen en conjunto como respuesta al buceo, y que se presentan cada vez que los pinnípedos se sumergen, consisten en suspender la ventilación pulmonar (apnea), disminuir el ritmo cardíaco (bradicardia) y dirigir el flujo sanguíneo hacia el cerebro y el corazón mediante vasoconstricción periférica (Kooyman y Ponganis 1998, Elsner 1999).

Mientras los pinnípedos bucean, la bradicardia y la vasoconstricción periférica desencadenan isquemia (suspensión del flujo sanguíneo) selectiva en todos los tejidos y órganos viscerales, con excepción del cerebro (Gooden y Elsner 1985). Al término de un buceo, con la primera respiración se recupera el ritmo cardíaco y se eliminan metabolitos ácidos y CO_2 al tiempo que se reestablece el flujo de sangre (reperfusión) y de oxígeno

(reoxigenación) hacia todos los tejidos y órganos (Elsner 1999). Aunque el grado de bradicardia y de vasoconstricción periférica varían dependiendo de la duración del buceo, mientras los pinnípedos bucean, todos sus órganos y tejidos experimentan una reducción en el abasto de oxígeno que resulta en hipoxia (Costa et al. 2001).

La isquemia/reperfusión es una patología que en mamíferos terrestres induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge 1999). El estrés oxidativo es una condición fisiopatológica originada cuando la tasa de producción de ERO excede a la tasa de descomposición de las mismas (Sies 1985).

El término ERO se refiere a los radicales libres de oxígeno y sus intermediarios. Los radicales libres de oxígeno son moléculas de existencia independiente con uno o más electrones desapareados en su último nivel de energía, que se forman en todas las células aerobias durante la reducción monovalente del oxígeno (O_2) que ocurre de manera constante en la cadena de transporte de electrones (Halliwell y Gutteridge 1999). En la primera reducción del O_2 se produce el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), anión que es precursor del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 y el $O_2^{\cdot-}$ pueden combinarse entre sí y/o con iones metálicos (reacciones de Haber-Weiss y Fenton) y dar lugar al radical oxhidrilo (HO^{\cdot}), que es capaz de reaccionar con carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos causando daño oxidativo. El daño oxidativo es trastorno celular ocasionado por las ERO que se ve reflejado en la oxidación de biomoléculas y puede producir muerte o pérdida de la función celular (McCord y Fridovich 1969, Halliwell y Gutteridge 1999, Hermes-Lima et al. 2001).

La isquemia/reperfusión induce la producción de ERO porque durante la isquemia, la degradación del ATP (producto de la disminución en la concentración de oxígeno) lleva a la acumulación de hipoxantina (HX) y al aumento de calcio intracelular, mecanismo que a

su vez activa lipasas y proteasas calcio-dependientes capaces de promover la conversión proteolítica de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO). Durante la reperfusión, la XO actúa sobre HX y O_2 generando $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , xantina y ácido úrico (Kuppusamy y Zweier 1989, Thompson-Gorman y Zweier 1990, Halliwell y Gutteridge 1999).

En las células animales, la producción y el efecto de las ERO son contrarrestados por mecanismos fisiológicos que pueden organizarse en tres grupos: 1) la inhibición de sistemas generadores de ERO; 2) la activación de sistemas reparadores de daño ocasionado por ERO, y 3) la concentración y actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, capaces de remover ERO o convertirlas en productos menos reactivos (Zenteno-Savín 2002). Los antioxidantes enzimáticos son el primer mecanismo de defensa contra las ERO ya que están involucrados directamente en las reacciones en cadena que las producen (Halliwell y Gutteridge 1999, Hermes-Lima et al. 2001, Hermes-Lima y Zenteno-Savín 2002). Los antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular como el glutatión (GSH) y las vitaminas, también participan directamente como atrapadores de ERO o como cofactores para enzimas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima que se presenta en animales en dos isoformas: mitocondrial y citosólica (McCord y Fridovich 1969, Hermes-Lima et al., 2001). La forma mitocondrial (Mn-SOD) utiliza manganeso como cofactor mientras que la forma citosólica (Cu,Zn-SOD) usa cobre y zinc (Fridovich 1998). Se ha identificado también una forma extracelular (EC-SOD) que también usa cobre y zinc como cofactores (Halliwell y Gutteridge 1999). La SOD es el primer mecanismo de defensa contra las ERO,

su función es catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 (McCord y Fridovich 1969, Pippenger et al. 1998).

La catalasa (CAT) es una proteína con un grupo férrico unido a su sitio activo, que se encuentra en el citosol y en los peroxisomas y cuya función principal es regular los niveles de H_2O_2 (Pippenger et al. 1998, Halliwell y Gutteridge 1999). La CAT también actúa en reacciones peroxidativas en las que están involucrados sustratos que donan hidrógeno, como metanol, etanol y fenoles (Aebi 1984, Pippenger et al. 1998). La glutatión peroxidasa (GPx) es otra enzima que regula los niveles de H_2O_2 , además de remover peróxidos orgánicos. Su mecanismo de acción consiste en conjugar al H_2O_2 con GSH dando como resultado agua y glutatión disulfuro (GSSG).

La glutatión-S-transferasa (GST) cataliza los procesos de detoxificación conjugando xenobióticos con GSH (Jakoby 1985). Específicamente, la GST cataliza el ataque nucleofílico del átomo de azufre del GSH en un segundo sustrato. La GST se localiza en el citoplasma, en el núcleo y en la superficie celular (Tsuchida 2000) y puede tener actividad acarreadora de muchos compuestos al actuar como ligandina, y actividad peroxidasa al remover productos de desecho de la peroxidación lipídica como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4HNE) (Prohaska 1980, Habing y Jakoby 1981). Al igual que para la GPx, las reacciones catalíticas de la GST involucran al GSH y dan como resultado GSSG.

El GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina) es, de entre los antioxidantes endógenos no enzimáticos de bajo peso molecular, el más abundante en las células animales. El GSH es un tiol tripéptido no proteico formado por residuos de cisteína, glicina y ácido glutámico; se

sintetiza mediante la catálisis de las enzimas glutamato cisteina ligasa (γ -glutamyl-cisteina sintetasa) y glutatión sintetasa (Kosower y Kosower 1978), resiste la degradación intracelular por peptidasas y participa en la remoción de HO^\bullet y oxígeno sigulete (O^\bullet) además de ayudar a mantener el ascorbato intracelular y de ser usado como co-factor por las enzimas GST y GPx en reacciones que promueven su oxidación a GSSG. El GSSG es reciclado a GSH por acción de la enzima glutatión disulfuro reductasa (GR) que usa NADPH como reductante; el NADPH es a su vez mantenido por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en un sistema cíclico que previene la pérdida de GSH (Prohaska 1980, Kosower y Kosower 1978, Meister y Anderson 1983, Halliwell y Gutteridge 1999). El GSH ha sido identificado como uno de los mecanismos antioxidantes que primero responden a la generación de ERO producto de cambios en la concentración de oxígeno celular y del medio en diferentes especies de animales (Hermes-Lima y Zenteno-Savín 2002).

El GSH y el GSSG son también la pareja óxido-reductora más abundante en tejidos animales; la tasa GSSG/2GSH se usa como indicador del estado celular de óxido-reducción (Kosower y Kosower 1978, Meister y Anderson 1983, Schaefer y Buettner 2001).

El presente trabajo está enfocado a estudiar los mecanismos que permiten a los pinnípedos contrarrestar la producción de ERO asociada a la respuesta al buceo y está dividido en dos capítulos. En el primero se estudió la participación del sistema del GSH como mecanismo de defensa contra las ERO producidas por la isquemia/reperfusión asociada al buceo, comparando los niveles de GSH, la actividad de las enzimas que lo reciclan y mantienen, y el daño oxidativo entre tejidos de foca y de cerdo. Se usaron tejidos

de cerdo debido a las similitudes que existen en cuanto a metabolismo y contenido adiposo entre focas y cerdos (Irving, 1956; Irving et al, 1956) y a las diferencias en cuanto a las adaptaciones al buceo que presentan ambas especies (Elsner 1999).

En el segundo capítulo se comparó la producción y el efecto de las ERO, además de la actividad de antioxidantes enzimáticos y el contenido de GSH entre tejidos de lobo marino de California y de focas de casco y de harpa. Se escogieron éstas especies debido a que presentan diferencias claras en sus capacidades fisiológicas de buceo (Burns et al. 2007, Weise y Costa 2007). Mientras que la foca de casco es el pinnípedo que realiza los buceos más largos y profundos del ártico (Folkow y Blix 1999), la foca de harpa realiza buceos a profundidades medias y por tiempos no muy prolongados (Folkow et al. 2004), y el lobo marino de California se caracteriza por bucear a poca profundidad y por poco tiempo (Kooyman 2002, Costa et al. 2004).

En ambos capítulos se usaron diferentes tejidos (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo) con base en las comparaciones realizadas en estudios anteriores (Elsner et al. 1995, 1998, Zenteno-Savín y Elsner 1998, 2000, Zenteno-Savin et al. 2002, Vazquez-Medina et al. 2006) y porque se sabe que la isquemia/reperfusión, derivada de los ajustes cardiovasculares asociados a la respuesta al buceo, es distinta en cada tejido (Elsner 1999).

2. Antecedentes

Los primeros en relacionar los antioxidantes con el buceo fueron Murphy y Hochachka (1981), quienes encontraron cambios inusuales en la concentración de GSH en la sangre de focas de Wedell después de ser sometidas a buceos forzados.

Tiempo después, Elsner et al. (1995) observaron mayor capacidad de recuperación y mayor concentración de HX en riñones y corazones de foca que en riñones y corazones de perro después de exponerlos a isquemia experimental. Tres años más tarde, los mismos autores encontraron mayor actividad de SOD en corazón de foca anillada que en corazón de cerdo, y mayor concentración de HX en corazón y riñón de foca anillada que de cerdo en condiciones basales (Elsner et al. 1998).

El mismo año Zenteno-Savín y Elsner (1998) encontraron producción diferencial de $O_2^{\cdot-}$ en distintos tejidos de foca anillada; dos años después, encontraron que la capacidad antioxidante total (AOX) no difiere significativamente entre los tejidos de la misma especie de foca (Zenteno-Savín y Elsner 2000). Más adelante, Zenteno-Savín et al. (2002) encontraron que la elevada AOX minimiza el potencial daño oxidativo derivado del buceo, pese a que existe una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en tejidos de foca anillada que en tejidos de cerdo.

También en el 2002, Wilhelm-Filho et al. registraron mayor actividad enzimática antioxidante y mayor concentración de GSH en la sangre de un grupo de mamíferos marinos que en la de un grupo de mamíferos terrestres (Wilhelm-Filho et al. 2002).

Dos años después, Johnson et al. (2004) mostraron que el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), una proteína que solamente es funcional en condiciones de hipoxia, y que regula la expresión de tres grupos de genes relacionados con el metabolismo

energético, el suplemento de oxígeno y la proliferación celular, está presente en el genoma de la foca anillada. En el 2005, otro trabajo de Johnson et al. (2005) sugiere que el HIF-1 interviene en el período posterior al buceo atenuando el estrés oxidativo derivado de la isquemia/reperfusión y hace más eficiente el re-llenado de los pulmones de foca.

Un año más tarde, Vázquez-Medina et al. (2006) encontraron que, en condiciones basales, existe mayor actividad de SOD, CAT, GPx y GST en tejidos de foca anillada que en tejidos de cerdo.

3. Capítulo I: Participación del sistema del glutatión como mecanismo de defensa contra la isquemia/reperfusión asociada al buceo en tejidos de foca anillada *

3.1 Justificación

En los pinnípedos, la primera respiración después de un buceo reestablece el flujo de sangre oxigenada hacia los tejidos isquémicos eliminando CO₂ y otros metabolitos (Kooyman y Ponganis 1998, Elsner 1999), al tiempo que incrementa la producción de O₂^{•-} (Zenteno-Savín y Elsner 1998); sin embargo, este incremento en la producción de ERO no se ve reflejado en el daño oxidativo aparente (Zenteno-Savín y Elsner 2000, Zenteno-Savín et al. 2002) debido en parte a la elevada actividad de enzimas antioxidantes (Vázquez-Medina et al. 2006). Hasta el momento no existen estudios de la participación de GSH como mecanismo de defensa antioxidante en tejidos de foca. Estudiar la concentración, el reciclaje y el mantenimiento de GSH en tejidos de foca permitirá conocer qué papel juega su disponibilidad para ser usado como sustrato por las enzimas antioxidantes y cuál es su participación en el mantenimiento de un ambiente óxido-reductor propicio para la homeostasis celular después del buceo. Lo anterior contribuirá a seguir conociendo los mecanismos que permiten a las focas tolerar ciclos repetitivos de isquemia/reperfusión derivados del buceo sin presentar daño oxidativo.

* Vázquez-Medina J P, Zenteno-Savín T, Elsner R. 2007. Glutathione protection against dive-associated ischemia/reperfusion in ringed seal tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 345, 110-118.

3.2 Objetivo general

Comparar la concentración de GSH, la actividad de las enzimas que lo mantienen y reciclan, y el daño oxidativo entre tejidos de foca y tejidos de cerdo.

3.3 Objetivos específicos

Medir la concentración tisular de glutatión total (GSH-Eq), de GSH, de GSSG, de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y de proteínas carboniladas en tejidos (corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo) de foca anillada y de cerdo común.

Calcular el estado de oxidación celular en tejidos de foca anillada y de cerdo común estableciendo la relación GSSG:GSH-Eq.

Medir la actividad de GR y G6PDH en tejidos de foca anillada y de cerdo común.

Comparar las variables medidas entre ambas especies.

3.4 Hipótesis

En los fócidos, la reoxigenación de los tejidos isquémicos, derivada de la respuesta al buceo, promueve la producción de ERO. Se sabe que las enzimas antioxidantes ayudan a contrarrestar dicha producción de ERO y a evitar el daño oxidativo. Por funcionar como cofactor para algunas enzimas antioxidantes, como atrapador de ERO y como componente esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular de óxido-reducción, se cree que la concentración y el mantenimiento del GSH son mecanismos de defensa importantes contra la isquemia/reperfusión derivada del buceo, y que tanto la concentración de GSH como la actividad de las enzimas GR y G6PDH, que reciclan y mantienen los niveles de glutatión celular, son más altas en tejidos de foca que en tejidos de cerdo, lo que contribuye a atenuar el potencial daño oxidativo asociado a la producción post-buceo de ERO.

3.5 Material y Métodos

3.5.1 Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras frescas de corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo de foca anillada (*Phoca hispida*) (4 hembras y 7 machos, peso promedio: 31.98 ± 3.47 kg,) y de cerdo común (*Sus scrofa*) (5 hembras y 5 machos, peso promedio: 73.40 ± 1.10 kg). Las muestras de foca fueron colectadas con la colaboración del Departamento de Vida Silvestre del Estado de Alaska y de los cazadores de subsistencia Inupiat cerca de Barrow, en la costa norte de Alaska, por medio de una disección ventral que se realizó para obtener aproximadamente 5 g de tejido que fueron almacenados en viales criogénicos y congelados al momento por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras de cerdo fueron obtenidas a partir de animales recién sacrificados en el rastro municipal de La Paz, B. C. S y sumergidas inmediatamente en nitrógeno líquido. Todas las muestras fueron transportadas al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) y almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

3.5.2 Reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron para los análisis bioquímicos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (San Luis, MO) con excepción de la 2-vinilpiridina (2VP) que se obtuvo de Fluka (Hanover, Alemania) y del kit para cuantificar proteínas que se obtuvo de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

3.5.3 Glutación y glutatión disulfuro

Se midió la concentración total de glutatión (GSH-Eq= GSH+2GSSG) siguiendo la tasa de reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) por el GSH a 412 nm y comparándola con la de una curva estándar de GSH (0-4 mM). Las muestras congeladas fueron homogenizadas 1:10 (peso/volumen) en ácido sulfosalicílico frío al 5%, previamente burbujeado con nitrógeno por 10 min. Los extractos crudos fueron burbujeados con nitrógeno por 10 s y posteriormente centrifugados a $19,000 \times g$ a 4°C durante 5 min. Los sobrenadanates se usaron para medir al momento la concentración de GSH-Eq como se describe a continuación. Se mezclaron en una celda H₂O, 20 µL de muestra, NADPH 0.3 mM (en solución amortiguadora de fosfatos: KPi 125 mM, pH 7.2; EDTA 6 mM), DTNB (6 mM) y GR (50 U/mL en KPi 125 mM, pH 7.2; EDTA 6 mM), se registró el cambio en la absorbancia por minuto a 412 nm (ΔA_{412}) durante 130 s y se calculó la concentración de GSH-Eq a partir la curva (Tietze 1969, Hermes-Lima y Storey 1995, 1996). Para cuantificar la concentración de GSSG se usó el método de Griffith (1980) con modificaciones (Hermes-Lima y Storey 1993, Ramos-Vasconcelos y Hermes-Lima 2003). Los extractos crudos se mezclaron con 2VP (0.5 M en etanol) y solución amortiguadora de fosfatos (0.5 M, pH 7.0) y fueron ajustados a pH 7.0 con NaOH (1 M), para después ser incubados en la oscuridad por una hora. Después de la incubación, se mezclaron en una celda H₂O, 150 µL de muestra, NADPH 0.3 mM (en KPi 125 mM, pH 7.2; EDTA 6 mM), DTNB (6 mM) y GR (50 U/mL en KPi 125 mM, pH 7.2; EDTA 6 mM). Se registró el ΔA_{412} durante 130 s y se calculó el contenido de GSSG a partir de una curva estándar (0-1.2 µM) que fue tratada igual que las muestras. El estado de oxidación celular

(GSSG/2GSH) se calculó usando las mediciones de GSSG y GSH-Eq, y se reporta como la relación GSSG:GSH-Eq. Los resultados fueron expresados en nanomoles de GSH-Eq, GSH o GSSG por g de tejido húmedo.

3.5.4 Actividad enzimática

3.5.4.1 Extractos tisulares

Las muestras fueron homogenizadas 1:20 (peso/volumen) en KPi (50 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM) con 1% de inhibidor de proteasas (PMSF en etanol) y se centrifugaron a $2,000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C; se desechó el precipitado e inmediatamente después se usó el sobrenadante para los análisis (Hermes-Lima et al. 1998, Vázquez-Medina et al. 2006).

3.5.4.2 Glutati6n disulfuro reductasa (EC 1.6.4.2)

La actividad de GR se midió monitoreando la oxidaci6n de NADPH por GSSG a 340 nm (Goldberg y Spooner 1983, Hermes-Lima y Storey 1995). Se mezclaron en una celda KPi (500 mM), EDTA (50 mM), NADPH (2 mM), H₂O, muestra y GSSG (10 mM). Se registr6 el cambio en la absorbancia a 340 nm (ΔA_{340}) cada 3 s durante 40 s. Se corrieron dos blancos, uno sin muestra y otro sin GSSG. La actividad de GR se calcul6 usando el coeficiente de extinci6n del NADPH (6.22 M/L) y se expres6 en mU de GR por mg de prote6na. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de GSSG por minuto.

3.5.4.3 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49)

La actividad de G6PDH se midió siguiendo el decremento de NADP^+ en un medio que contenía KPi (500 mM), MgSO_4 (5 mM), NADP^+ (0.2 mM), glucosa-6-fosfato (2 mM), H_2O y muestra (Lushchak et al. 2001). Se registró el ΔA_{340} cada segundo durante 20 segundos; se calculó la actividad y se expresó en mU de G6PDH por mg de proteína. Una unidad de G6PDH se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmol de NADP^+ por minuto.

3.5.5 Daño oxidativo

3.5.5.1 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se midió cuantificando el contenido tisular de sustancias reactivas al ácido tiobartibútrico (TBARS) (Okhawa et al. 1979, Persky et al. 2000, Zenteno-Savín et al. 2002). Se homogenizaron 100 mg de tejido en 2 mL de solución salina (0.9 %) fría y se centrifugaron a $2,000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Se tomaron 250 μL del sobrenadante que fueron colocados en tubos e incubados 15 minutos en un baño de agua con agitación continua a 37°C . Después, los tubos fueron colocados en un baño de hielo y se adicionaron 250 μL de TCA al 12.5 % (en HCl) y posteriormente 500 μL de TBA en agitación al 1%. Los tubos fueron nuevamente incubados en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos y centrifugados otros 10 minutos a $2,000 \times g$ a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 nm. Los resultados se calcularon a partir de una curva estándar de malondialdehido bis-(dietilacetal) que fue corrida en paralelo con las muestras y se expresaron en nanomoles de TBARS por g de tejido húmedo.

3.5.5.2 Proteínas carboniladas

El daño oxidativo a proteínas se midió cuantificando la cantidad de proteínas carboniladas siguiendo la técnica de Levine et al. (1990, 1994) que se basa en la formación de un complejo entre los derivados carbonilados de las proteínas y la 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH). Las muestras congeladas se homogenizaron 1:20 (peso/volumen) en ácido sulfosalicílico frío al 5 % y se centrifugaron a $19,000 \times g$ a 4°C durante 5 min. Se removió el sobrenadante y a los precipitados se le adicionó DNPH (10 mM en HCl 2 M) para posteriormente incubarlos 1 h a temperatura ambiente agitándose cuatro veces durante 40 s. Después se adicionó 0.5 mL de TCA al 20 % a los tubos que de nuevo fueron centrifugados a $19,000 \times g$ durante 3 min. Los sobrenadantes fueron nuevamente desechados y el exceso de DNPH se removió lavando los precipitados 3 veces con una mezcla de etanol y acetato de etilo (1:1) y centrifugándolos a $19,000 \times g$ a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, los precipitados fueron disueltos en clorato de guanidina (6 M), incubados 15 min a 37°C y centrifugados a $19,000 \times g$ por 5 min. Se volvieron a recuperar los sobrenadantes y se les registró la absorbancia máxima en un rango de 360-410 nm para poder calcular la concentración final de proteínas carboniladas usando el coeficiente de extinción de 22 milimoles/L. Se prepararon blancos reemplazando la DNPH con HCl (2 M) que fueron corridos en paralelo con las muestras. Los resultados se expresaron en en nanomoles de proteínas carboniladas por g de tejido húmedo.

3.5.6 Proteínas solubles

La cantidad de proteínas solubles en los extractos tisulares se midió para estandarizar los valores de actividad enzimática, usando un kit comercial basado en el método descrito por Bradford (1976). Se preparó una curva estándar de albúmina de suero bovino (0.2-0.005 mg/mL). Las muestras se diluyeron 1:100 con KPi (50 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM). Se preparó un blanco con agua y colorante Coomassie®. En una microplaca, se agregó a cada pozo H₂O, colorante Coomassie® y curva estándar o muestra. Después de 15 minutos, se leyó la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteínas solubles se calculó a partir de la ecuación de la recta ajustada a la curva estándar y se expresó en mg de proteína por mL.

3.5.7 Análisis estadísticos

Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media. Con los datos obtenidos se hicieron estadísticas descriptivas y pruebas de normalidad (Shapiro-Wilkins) y de homocedasticidad (Levene). Para detectar diferencias significativas entre especies y entre tejidos se utilizó el análisis de variancia por rangos de Kruskal-Wallis seguido de una U de Mann-Whitney (Zar 1999). Todos los análisis estadísticos se hicieron usando el paquete SYSTAT® 11.0.

3.6 Resultados

3.6.1 Glutación y glutación disulfuro

Los resultados de las mediciones de GSH-Eq, GSH, GSSG y GSSG:GSH-Eq se resumen en la Tabla 1 y en la figura 1. El contenido de GSH-Eq fue más alto en corazón,

riñón, pulmón y músculo de foca que de cerdo ($p < 0.05$) y no presentó diferencias significativas entre especies en el hígado (Fig. 1A). Todos los tejidos de foca, con excepción del hígado, tuvieron mayores niveles de GSH ($p < 0.05$) que los tejidos de cerdo (Tabla 1). El contenido de GSH fue mayor ($p < 0.05$) en el corazón que en el riñón y el pulmón, y en el hígado y el músculo de foca (Tabla 1). El contenido de GSSG fue mayor ($p < 0.05$) en el corazón, riñón, hígado y músculo de foca que de cerdo, y más alto ($p = 0.00001$) en el corazón y el músculo que en el resto de los tejidos de foca (Tabla 1). La tasa GSSG:GSH-Eq fue más alta ($p < 0.05$) en el corazón y pulmón de cerdo que en los mismos tejidos de foca, más alta en el hígado y el músculo de foca que en el cerdo ($p < 0.05$) y no presentó diferencias entre especies en el riñón (Fig. 1B). El mayor valor ($p = 0.000125$) de la tasa GSSG:GSH-Eq en los tejidos de foca se observó en el músculo (Tabla 1).

Tabla I. Concentraciones de glutatión total (GSH-Eq), glutatión (GSH) y glutatión disulfuro (GSSG) en nmol/g de tejido húmedo, y tasa GSSG:GSH-Eq en tejidos de foca anillada ($n=11$) y cerdo común ($n=10$).

Especie	Tejido	GSH-Eq (GSH + 2GSSG)	GSH (reducido)	GSSG (oxidado)	GSSG:GSH-Eq
Foca	Corazón	2918.14 ± 227.23 ^a	2621.40 ± 241.48 ^a	148.36 ± 10.19 ^a	0.0578 ± 0.009 ^b
	Riñón	1121.79 ± 19.15 ^c	1071.38 ± 20.74 ^b	25.20 ± 2.59 ^c	0.0226 ± 0.002 ^b
	Hígado	327.24 ± 4.28 ^b	266.52 ± 4.18 ^c	30.4 ± 0.29 ^c	0.0928 ± 0.001 ^b
	Pulmón	830.24 ± 5.69 ^c	822.16 ± 5.69 ^b	4.04 ± 0.06 ^b	0.0048 ± 0.00 ^b
	Músculo	742.47 ± 67.54 ^c	369.54 ± 37.62 ^c	186.46 ± 21.64 ^a	0.5424 ± 0.06 ^a
Cerdo	Corazón	117.47 ± 0.04 [*]	73.57 ± 4.545 [*]	21.95 ± 2.28 [*]	0.133 ± 0.01 [*]
	Riñón	490.33 ± 142.02 [*]	473.25 ± 142.26 [*]	8.54 ± 0.31 [*]	0.022 ± 0.002
	Hígado	451.21 ± 33.33	443.85 ± 33.11	3.68 ± .31 [*]	0.008 ± 0.001 [*]
	Pulmón	262.69 ± 65.08 [*]	248.31 ± 68.02 [*]	7.18 ± 1.64	0.060 ± 0.021 [*]
	Músculo	124.47 ± 7.22 [*]	66.81 ± 5.895 [*]	28.83 ± 2.74 [*]	0.157 ± 0.008 [*]

Los resultados se presentan como media ± error estándar. Letras distintas denotan diferencias significativas entre tejidos (sólo para foca anillada); * = diferencias significativas por tejido entre especies, $p < 0.05$.

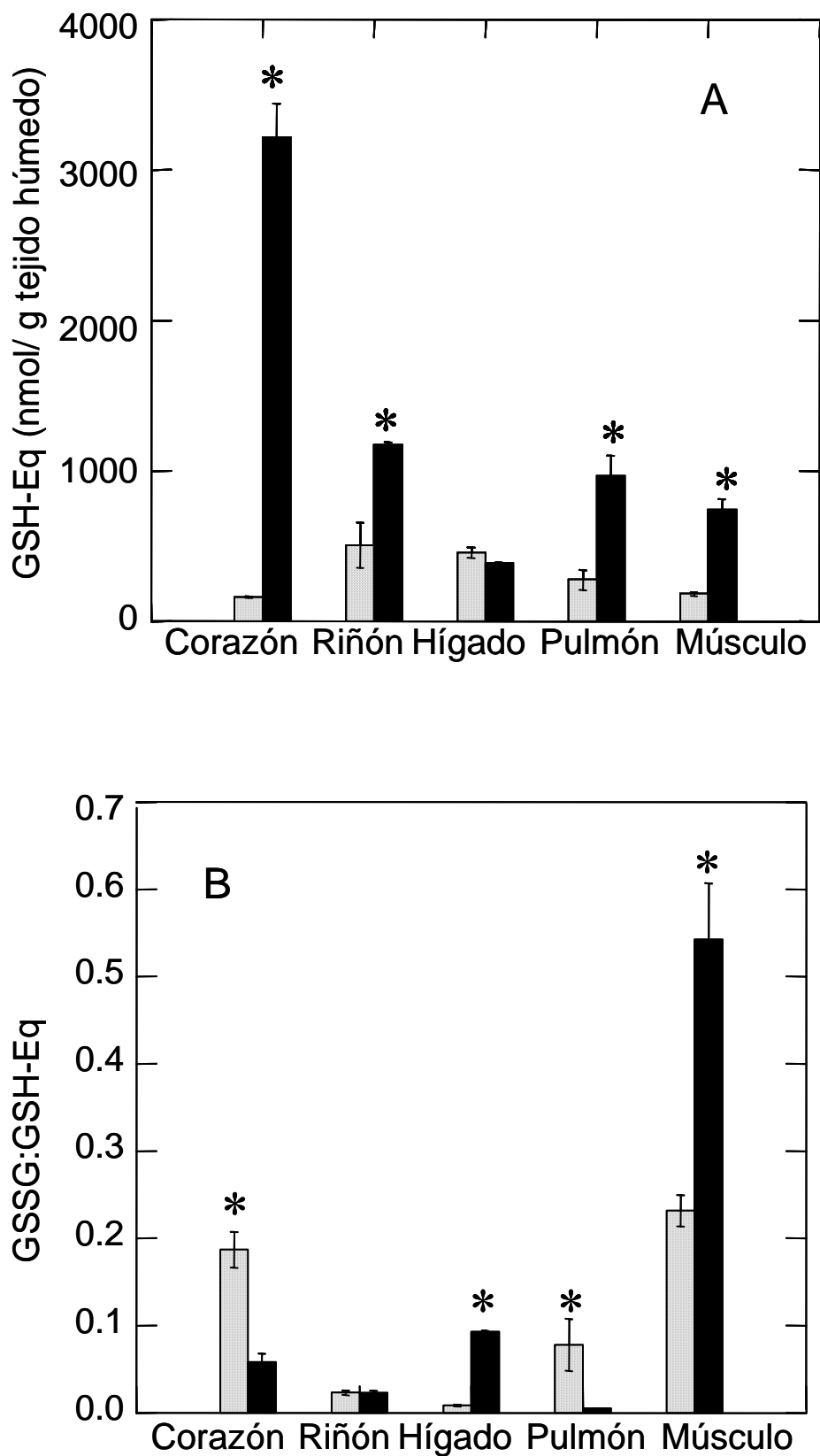


Figura 1. A: Contenido total de glutatión (GSH-Eq= GSH+2GSSG) y B: tasa GSSG:GSH-Eq en tejidos de cerdo común (▨ n=10) y foca anillada (■ n=11). Los resultados se presentan como media \pm error estándar. *= diferencias significativas por tejido entre especies, $p < 0.05$.

3.6.2 Actividad enzimática

La actividad de GR y de G6PDH fue mayor ($p < 0.05$) en todos los tejidos de foca que en los de cerdo (Fig. 2). No se encontraron diferencias significativas en la actividad de GR entre los tejidos de foca (Tabla 2). La mayor actividad de G6PDH ($p < 0.0001$) entre los tejidos de foca se registró en el hígado (Fig. 2B, Tabla 2). El corazón de foca presentó menor ($p < 0.0001$) actividad de G6PDH que el hígado (Tabla 2).

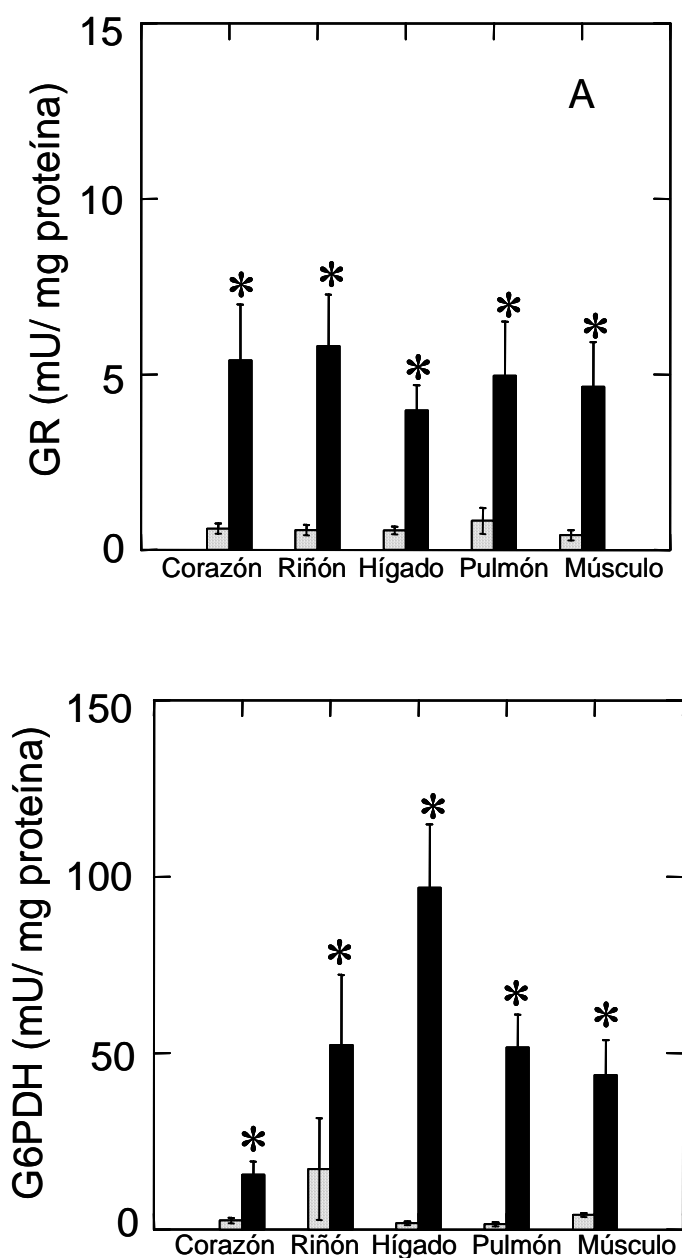


Figura 2. Actividad de A: glutatión disulfuro reductasa (GR) y B: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en tejidos de cerdo común (■ n=10) y foca anillada (▒ n=11). Los resultados están expresados en miliunidades por mg de proteína y se presentan como media \pm error estándar. *= diferencias significativas por tejido entre especies, $p < 0.05$.

Tabla II. Actividad enzimática de glutatión disulfuro reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en mU/mg de proteína y marcadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas en nmol/g de tejido húmedo en tejidos de foca anillada (n=11).

Tejido	GR	G6PDH	TBARS	Proteínas carboniladas
Corazón	7.52 ± 2.52	15.56 ± 3.551 ^a	0.252 ± 0.02 ^a	85.35 ± 21.18 ^a
Riñón	5.80 ± 1.40	121.32 ± 42.72 ^{ab}	0.107 ± 0.01 ^c	128.22 ± 12.33 ^a
Hígado	3.97 ± 0.67	134.47 ± 27.96 ^b	0.672 ± 0.08 ^b	63.72 ± 9.49 ^a
Pulmón	6.65 ± 2.11	67.64 ± 17.85 ^{ab}	0.234 ± 0.00 ^c	281.53 ± 40.59 ^b
Músculo	4.65 ± 1.20	71.78 ± 29.19 ^{ab}	0.330 ± 0.05 ^c	369.50 ± 31.86 ^b

Los resultados se presentan como media ± error estándar. Letras distintas denotan diferencias significativas entre tejidos, p<0.05. TBARS = sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

3.6.3 Daño oxidativo

El contenido de TBARS fue mayor (p<0.05) en el corazón y el pulmón de cerdo que en los de foca, y menor (p=0.01) en el músculo de cerdo (Fig. 3A). El valor más alto (p=0.005) de TBARS entre los tejidos de foca se observó en el hígado y el más bajo (p=0.0001) en el riñón (Fig. 3A, Tabla 2). Se registró mayor (p<0.05) contenido de proteínas carboniladas en corazón, riñón, hígado y músculo de cerdo que de foca (Fig. 3B). El pulmón y el músculo fueron los tejidos que presentaron el mayor contenido de proteínas carboniladas (p=0.0001) de entre los tejidos de foca (Tabla 2).

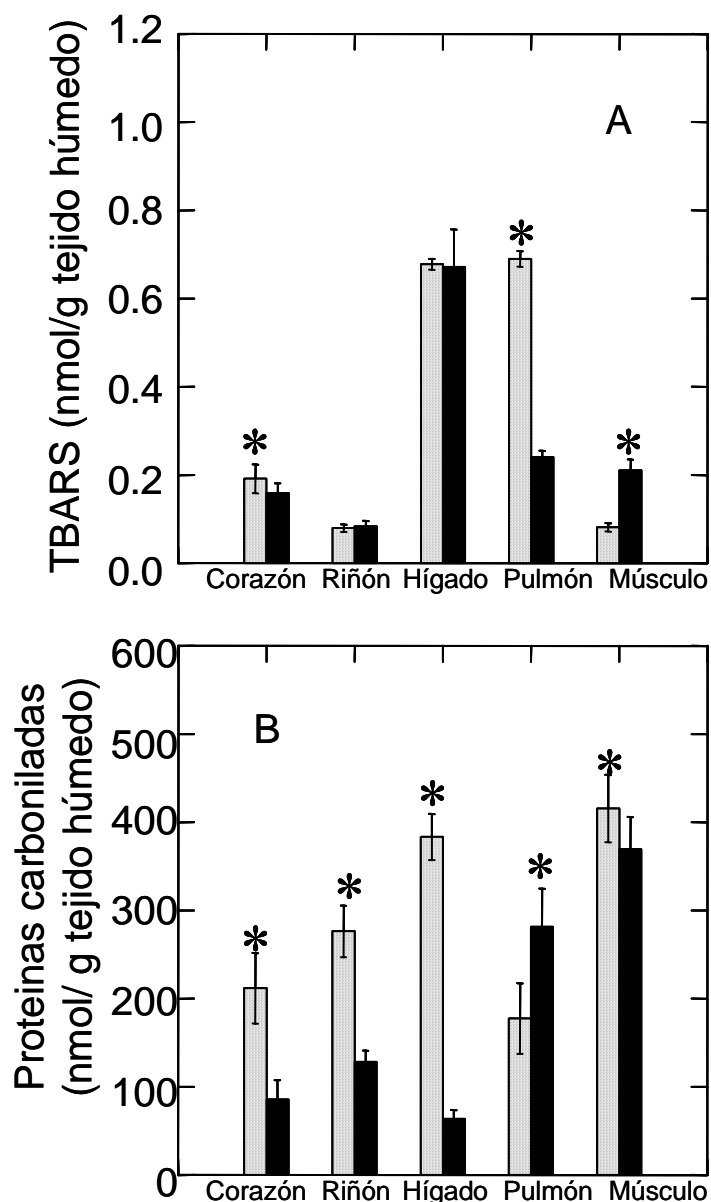


Figura 3. A: Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) y B: proteínas carboniladas (nmol/g de tejido húmedo) en tejidos de cerdo común (□n=10) y foca anillada (■n=11). Los resultados se presentan como media \pm error estándar. *= diferencias significativas por tejido entre especies, $p < 0.05$.

3.7. Discusión

La tasa de utilización del GSH en reacciones de óxido-reducción, la reducción enzimática de hidroperóxidos, el metabolismo de xenobióticos y la regeneración de formas reducidas de pares óxido-reductores son factores que regulan los niveles intracelulares de GSH (Kirlin et al. 1999, Schafer et al. 2000). Mayor contenido de GSH-Eq, GSH y GSSG (Tabla 1) y mayor actividad de GR y G6PDH (Fig. 2) en corazón, riñón, pulmón y músculo de foca que de cerdo, sugieren que el reciclamiento y

mantenimiento del GSH en tejidos de foca ocurre a tasas elevadas, lo que permite sustentar la hipótesis de la disponibilidad permanente y la participación activa de este tripéptido como co-sustrato para GPx o GST y como atrapador de ERO producidas en respuesta a los ajustes cardiovasculares asociados al buceo en tejidos de foca (Vázquez-Medina et al. 2006).

Estudios anteriores (Zenteno-Savín y Elsner 1998, Zenteno-Savín y Elsner 2000, Zenteno-Savín et al. 2002) mostraron que la producción de $O_2^{\bullet-}$ es más alta en corazón, riñón y músculo de foca que de cerdo como consecuencia de la isquemia/reperfusión asociada a la respuesta al buceo (Elsner, 1999); sin embargo, el daño oxidativo a lípidos y proteínas no está relacionado con esta mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ (Fig. 3). Aparentemente, la actividad de SOD, CAT, GPx y GST contrarresta de manera eficiente la producción de ERO en el corazón, el hígado, el pulmón y el músculo de foca, más no en el riñón (Elsner et al. 1998, Vázquez-Medina et al. 2006).

El riñón de foca es uno de los tejidos más tolerantes a la isquemia (Halasz et al. 1974, Behrisch y Elsner 1980); en él se acumulan cantidades altas de HX durante el buceo (Elsner et al. 1995, Elsner et al. 1998) que podrían incrementar la producción de $O_2^{\bullet-}$ durante la reperfusión. Aparentemente, la alta producción de $O_2^{\bullet-}$ asociada al buceo es compensada por una elevada capacidad antioxidante total en el riñón de foca (Zenteno-Savín et al. 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo (Fig. 1A) ayudan a respaldar la idea de que los antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular, como el GSH, juegan un papel crucial como mecanismos de defensa contra las ERO en el riñón de foca. Está ampliamente documentado que la producción mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ en cantidades elevadas es contrarrestada con niveles altos de GSH (Halliwell y Gutteridge 1999) y que durante la isquemia existe un incremento en el suplemento de los precursores de GSH además de múltiples estímulos que activan a la GSH sintetasa,

lo cual se ve reflejado en la disminución de los niveles de peroxidación lipídica en modelos *in vivo* (Kamencic et al. 2001).

El trabajo de Murphy y Hochachka (1981) señala que existe un aumento en la concentración circulante de GSH en focas sometidas a buceos forzados. Los resultados de Wilhem-Filho et al. (2002) indican que existen mayores concentraciones de GSH en la sangre de un grupo de mamíferos marinos que en la de un grupo de mamíferos terrestres. Niveles altos de GSH han sido también observados en otros tejidos de animales expuestos a cambios en la disponibilidad de oxígeno debido a hibernación, estivación, desecación, hipoxia ambiental o buceo (Hermes-Lima y Zenteno-Savín 2002, Ramos-Vasconcelos y Hermes-Lima 2003, Bickler, 2004, Ramos-Vasconcelos et al. 2005, Willmore y Storey 2005). Lo anterior refuerza la idea de la participación activa del GSH contra la toxicidad de las ERO producidas durante la reperfusión en tejidos de foca.

La homeostasis de óxido-reducción intracelular es necesaria para la expresión de genes, la activación de enzimas y el control de los niveles de ERO (Arrigo 1999). Mayores niveles en el estado de oxidación celular (GSSG:GSH-Eq) registrados en el músculo de foca que en el músculo de cerdo (Fig. 1B) probablemente están relacionados con la mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ reportada por Zenteno-Savín et al. (2002) para este tejido y podrían estarse reflejando en contenidos más altos de TBARS (Fig. 3A) pero no en niveles mayores de proteínas carboniladas (Fig. 3B). Lo anterior vuelve a sugerir la participación activa del GSH en contra de la toxicidad de ERO altamente reactivas como el HO^{\cdot} , previniendo la oxidación de proteínas y balanceando el estado de óxido-reducción celular (Arrigo 1999). El pulmón fue el único tejido que presentó niveles significativamente más altos de proteínas carboniladas en la foca que en el cerdo (Fig. 3B). Los pulmones de las focas se colapsan durante el buceo por la respuesta de los

quimiorreceptores periféricos y de los barorreceptores arteriales a la bradicardia, con el fin de evitar barotraumas debidos a la acumulación de nitrógeno y para ayudar al descenso (Kooyman y Ponganis 1998, Elsner 1999). Lo anterior trae como consecuencia que el pulmón se aíse y se exponga a isquemia aguda durante un buceo. Esta exposición aguda a isquemia, aunada a que este tejido es el primero en recibir la reintroducción de oxígeno (Elsner 1999), potencialmente elevaría la producción de ERO que, pese a ser contrarrestada por la actividad de SOD y GPx (Vázquez-Medina et al. 2006) y por concentraciones elevadas de GSH (Fig. 1, Tabla 1), puede tener un efecto en la concentración de proteínas carboniladas en este tejido (Fig. 3B). Vázquez-Medina et al. (2006) encontraron menor actividad de CAT en el pulmón de foca que en el de cerdo; el trabajo de Johnson et al. (2004) mostró concentraciones más altas de proteínas oxidadas en este tejido que en los tejidos cardíaco, renal, hepático o muscular de focas anilladas. Por otra parte, Shunemann et al. (2002) indican que en los pulmones de pacientes humanos los antioxidantes vitamínicos desempeñan un papel de primer orden contra la toxicidad de las ERO. En conjunto, todo lo anterior abre la posibilidad para suponer que son mecanismos antioxidantes combinados, incluyendo los dependientes de la dieta, los que ayudan a evitar el daño oxidativo generado por la producción post-buceo de ERO en el tejido pulmonar de las focas. Pese a que está ampliamente documentado (Southcott et al. 1971, Engelhardt et al. 1975, Schweigert et al. 1987, 1990a,b, 1991, Ghebremeskel y Williams 1988, Raila et al. 2000, Debier et al. 2002) que no existen diferencias importantes en la concentración de vitaminas entre mamíferos marinos y terrestres, también se sabe que el aporte vitamínico del zooplancton y los peces del ártico a la dieta de las focas es significativamente distinto (Kenny et al. 2004). Al ser la foca anillada un depredador no selectivo capaz de alimentarse de más de 72 tipos distintos de presas y con un patrón alimenticio variable

dependiendo de la temporada y la posición geográfica (King 1983, Riedman 1990), es probable que esté expuesta a cambios importantes en el aporte vitamínico que recibe de la dieta.

La tasa GSSG:GSH-Eq fue más alta en el hígado de foca que en el de cerdo sin llegar a verse reflejada en el daño oxidativo a lípidos o proteínas (Fig. 3). La acumulación de metabolitos oxidados, que repercute directamente en el estado de óxido-reducción celular, ha sido observada en el hígado de truchas después de periodos de ayuno prolongado (Barroso et al. 1998). Es probable que en el hígado de foca se presente el mismo fenómeno debido a los ajustes cardiovasculares asociados al buceo que resultan en isquemia, hipoxia y producción de ERO y que pueden tener un impacto directo en los valores de la tasa GSSG:GSH-Eq. Es importante recalcar que el hígado de cerdo fue el único tejido que presentó concentraciones más altas (aunque no significativas) de GSH y GSH-Eq que su análogo de foca (Tabla 1, Fig. 1). Es posible que las reacciones de destoxificación de segundo nivel que involucran la participación de enzimas como la GST (Tsuchida y Sato 1992, Kirilin et al. 1999) promuevan la acumulación de GSH en el tejido hepático de cerdo para sostener la alta actividad de esta enzima (Vázquez-Medina et al. 2006).

La mayor actividad de GR y de G6PDH observada en todos los tejidos de foca en comparación con los tejidos de cerdo (Fig. 2) puede estar contribuyendo a conservar la homeostasis celular óxido-reductora. La GR es una enzima que juega un papel muy importante en el mantenimiento del glutatión en su forma reducida al convertir el GSSG a GSH a expensas de NADPH (Fujii et al. 2000). La G6PDH también tiene un papel crucial en el metabolismo del GSH al transformar NADP^+ en NADPH e inhibir la muerte celular inducida por H_2O_2 al alterar el potencial de óxido-reducción para mantener constantes los niveles de GSH (Tian et al. 1999, Leopold y Loscalzo 2000).

Del mismo modo, se ha sugerido que la respuesta contra la producción de ERO derivada de la reoxigenación en animales adaptados a la hipoxia ambiental y metabólica involucra incrementos en la actividad de GR y G6PDH (Lushchak et al. 2001, Hermes-Lima y Zenteno-Savín 2002).

Se sabe que los ajustes cardiovasculares que permiten a las focas bucear traen como consecuencia isquemia y reperfusión diferenciales entre los tejidos de foca durante y después del buceo (Elsner et al. 1966, 1995, Gooden y Elsner 1985), lo que a su vez podría promover diferencias en la producción post-buceo de ERO (Zenteno-Savín y Elsner 2000), en la respuesta enzimática antioxidante (Vazquez-Medina et al. 2006) y en los niveles de GSH (Tabla 1). Durante un buceo, el corazón de foca recibe flujo sanguíneo intermitente que resulta en la disminución del consumo de oxígeno necesario para mantener la función cardíaca (Gooden y Elsner 1985, Elsner 1999). Estas reducciones intermitentes en el flujo sanguíneo parecen preconditionar el tejido cardíaco de foca para tolerar eventos de isquemia/reperfusión prolongados induciendo la actividad de SOD, GPx y GST (Elsner et al. 1998; Vazquez-Medina et al. 2006), la actividad de GR y G6PDH (Fig. 2), el incremento en la concentración de GSH y GSH-Eq (Tabla 1, Fig.1) y, probablemente, otros mecanismos involucrados en la señalización celular dependiente de oxígeno, como la acumulación del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) (Johnson et al. 2004, Johnson et al. 2005). El HIF-1 es un factor de transcripción que coordina la respuesta homeostática a la hipoxia regulando la expresión de genes vasculares, del metabolismo energético y del ciclo celular (Bunn y Poyton 1996) y que recientemente ha sido involucrado en la regulación del factor de choque térmico (Hsf), el elemento principal en la activación de la respuesta mediada por las proteínas de choque térmico (HSPs) contra la producción de ERO y otros eventos que producen estrés metabólico (Date et al. 2005, Baird et al. 2006).

En modelos terrestres, la suplementación de GSH en la dieta protege al corazón contra la isquemia/reperfusión (Ahmad et al. 2001, Ramires y Ji 2001). En otros trabajos, se ha demostrado que los niveles de GSH son, aparentemente, el mecanismo celular que regula la actividad de GPx y la cantidad de H₂O₂ en respuesta a cambios en los niveles de oxígeno en la arteria coronaria (Mohazzab-H et al. 1999) y que controlan la presión parcial de oxígeno (PO₂) (Del Corso et al. 2002). Además, existen otros estudios (Haddad 2002a, 2002b, 2002c, Haddad y Harb 2005) que describen detalladamente cómo el GSH puede controlar la activación no hipóxica del HIF-1 α , mediante un modelo de regulación contrario al propuesto originalmente para esta proteína (Richard et al. 2000).

Se ha sugerido que un ambiente celular altamente reducido es necesario para la estabilización no hipóxica del HIF-1 mediante la interacción de las subunidades proteicas HIF-1 α y HIF-1 β (Salceda y Caro 1997). En la anguila del mar del Norte la hipoxia inducida por frío o calor (que tiene las mismas implicaciones metabólicas que la isquemia/reperfusión para los mamíferos) propicia un ambiente celular más reducido mediado por niveles más altos de GSH, que incrementa estabilización y la unión del HIF-1 al ADN antes de la reoxigenación (Heise et al. 2006a, 2006b).

Mantener niveles elevados de GSH en preparación para la producción post-buceo de ERO (Hermes-Lima y Zenteno-Savin 2002, Zenteno-Savín et al. 2002) parece ser un mecanismo importante para contrarrestar la isquemia/reperfusión asociada al buceo, debido a que el reciclamiento de GSH es más rápido y menos costoso que sintetizar enzimas *de novo* (Kosower y Kosower 1978, Meister y Anderson 1983). Además es probable que el GSH controle la acumulación y estabilización del HIF-1, que existe en el genoma de la foca anillada (Johnson et al. 2004) y cuyos productos parecen acumularse de manera constante en el corazón, el riñón, el pulmón y el músculo

(Johnson et al. 2005), sugiriendo una participación importante de estas proteínas como mecanismos de defensa involucrados en la posible preparación anticipada contra la producción post-buceo de ERO. También es probable que en los tejidos de foca, el GSH promueva un ambiente celular altamente reducido que, como sucede en la anguila del mar del Norte (Heise et al. 2006a, 2006b, 2007), induzca la translocación y la unión del HIF-1 al ADN (Huang et al. 1996, Ema et al. 1999, Lando et al. 2000).

Una ventaja más de mantener niveles altos de GSH es la capacidad que tiene este tiol para remover el peroxinitrito, un oxidante altamente reactivo formado por la interacción del $O_2^{\cdot-}$ con óxido nítrico (NO^{\cdot}) (Agani et al. 2002) que se podría estar produciendo a tasas elevadas en los tejidos de foca anillada debido a la elevada producción de $O_2^{\cdot-}$ derivada de la isquemia/reperfusión asociada al buceo (Zenteno-Savín et al. 2002).

En resumen, la primera parte de este estudio mostró que los niveles de GSH y la actividad de las enzimas implicadas en su reciclaje y mantenimiento juegan un papel de primer orden como mecanismos de defensa antioxidante contra la producción de ERO derivada de la isquemia/reperfusión asociada al buceo en tejidos de foca anillada, disminuyendo el daño oxidativo a lípidos y proteínas y propiciando un ambiente celular altamente reducido. Este último probablemente controla la activación de otros mecanismos necesarios para mantener la homeostasis durante la reoxigenación, al tiempo que promueve la respuesta anticipada contra la producción post-buceo de ERO.

3.8 Conclusiones

La concentración de GSH es significativamente mayor en corazón, riñón, pulmón y músculo de foca que de cerdo, lo que da idea de la posible participación de este tiol como una molécula que mantiene un ambiente celular reducido, atrapa ERO y funciona como cofactor para enzimas antioxidantes.

La actividad de GR y G6PDH es también mayor en todos los tejidos de foca que en los de cerdo, lo que da cuenta de la eficiencia del sistema de reciclaje y mantenimiento del GSH, que promueve su disponibilidad permanente para ser usado como cofactor enzimático, atrapar ERO y mantener un estado de óxido-reducción óptimo para el funcionamiento y la activación de otros mecanismos implicados en la respuesta homeostática contra la producción post-buceo de ERO.

El daño oxidativo a lípidos y proteínas es significativamente menor o igual en corazón, riñón, hígado y músculo de foca que de cerdo a pesar de la elevada producción de ERO derivada de la isquemia/reperfusión asociada al buceo, lo que indica que el GSH, en conjunto con enzimas antioxidantes, contrarresta de manera eficiente a las ERO evitando el daño oxidativo y permitiendo a los tejidos de foca estar expuestos a ciclos repetitivos de isquemia/reperfusión derivados del buceo.

4. Capítulo II: Producción de radical superóxido, daño oxidativo y defensas antioxidantes en tejidos de focas y lobos marinos

4.1 Justificación

Se sabe que todos los pinnípedos están sujetos, por su condición de buceadores, a bradicardia y vasoconstricción periférica que derivan en isquemia selectiva durante el buceo (Hochachka 2000). Por otra parte, también se sabe que la capacidad que tienen las diferentes especies de pinnípedos para bucear a profundidades y por periodos de tiempo distintos, que a su vez depende de las reservas corporales de oxígeno (capacidad fisiológica de buceo) de cada especie (Weise y Costa 2007, Burns et al. 2007), genera diferentes intensidades de isquemia durante el buceo (Elsner 1999, Costa et al. 2001), que podrían derivar en una producción diferencial de ERO en la reperfusión, la cual tendría que ser contrarrestada de manera distinta dependiendo de su intensidad. Hasta el momento se desconoce cómo están preparadas las diferentes especies de pinnípedos para tolerar la producción de ERO derivada de los ciclos de isquemia/reperfusión asociados al buceo. Estudiar la producción de ERO, el metabolismo de antioxidantes y el daño oxidativo en especies con capacidades de buceo distintas contribuirá al conocimiento de los mecanismos que permiten a los pinnípedos bucear.

4.2 Objetivo General

Comparar la capacidad para producir ERO, el daño oxidativo, la actividad enzimática antioxidante y la concentración de GSH entre tejidos de 2 especies de fócidos y una de otáridos.

4.3 Objetivos específicos

Medir la producción de $O_2^{\bullet-}$ en tejidos (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo) de 3 especies de pinnípedos (foca de casco, foca de arpa y lobo marino de California).

Medir la concentración de TBARS y de proteínas carboniladas en tejidos de 3 especies de pinnípedos.

Medir la actividad enzimática de SOD, CAT, GST, GPx y GR en tejidos de 3 especies de pinnípedos.

Medir la concentración de GSH-Eq, GSH y GSSG en tejidos de 3 especies de pinnípedos.

Calcular el estado de oxidación celular (GSSG:GSH-Eq) en tejidos de 3 especies de pinnípedos.

Comparar los resultados de las mediciones obtenidas entre los tejidos de las 3 especies.

4.4 Hipótesis

El grado de bradicardia, de vasoconstricción periférica y de isquemia varían con la duración del buceo y podrían derivar en una producción diferencial post-buceo de $O_2^{\bullet-}$, se cree que en los tejidos de las especies que tienen mayor capacidad fisiológica de buceo, existe mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ y también mayor actividad y concentración de antioxidantes enzimáticos y de GSH, que funcionan como mecanismos de preparación contra la producción post-buceo de ERO, atenuando el daño oxidativo y permitiendo a las focas que bucean por periodos de tiempo más largos, tolerar episodios más agudos de isquemia/reperfusión asociados a la respuesta al buceo.

4.5 Material y Métodos

4.5.1 Obtención de Muestras

Se colectaron muestras frescas de cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, y músculo de foca de casco (*Cystophora cristata*), foca de arpa (*Phoca groenlandicus*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*). Todas las muestras fueron obtenidas a partir de animales adultos usando métodos aprobados para la colecta científica y bajo los lineamientos de los permisos correspondientes. Las focas adultas se distinguieron de las jóvenes usando métodos visuales (Stewart y Lavigne 1980, Bowen et al. 1987). Los lobos marinos fueron identificados como machos adultos por la presencia de una cresta sagital.

Las muestras de foca de casco (5 hembras, peso promedio 249.3 ± 25.2 kg) y de foca de arpa (4 hembras, peso promedio 125.7 ± 14.5 kg) se obtuvieron en las islas Magdalena (Canadá) con ayuda de la Guardia Costera Canadiense. Los animales fueron capturados, pesados, sexados y sacrificados usando métodos aprobados para la colecta científica en Canadá. Se colectaron aproximadamente 5 g de cada tejido, por medio de una disección ventral, que fueron almacenados en viales criogénicos, congelados a -20 °C y guardados a -80 °C.

Las muestras de lobo marino de California (10 machos, longitud estándar promedio 202.5 ± 50.1 cm) se obtuvieron a partir de animales muertos varados frescos (menos de 6 horas de muertos) en Cabo San Lázaro, Isla Magdalena, B. C. S., México. Previo a la disección, se registró la longitud y el género de cada individuo. Se colectaron aproximadamente 5 g de cada tejido que fueron almacenados en viales criogénicos y congelados a -20 °C.

Todas las muestras fueron transportadas al CIBNOR y almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

4.5.2 Reactivos

La mayoría de los reactivos usados para los análisis bioquímicos se obtuvo de Sigma (San Luis, MO). La 2-vinilpiridina (2VP) se obtuvo de Fluka (Hanover, Alemania) y los kits para cuantificar proteínas solubles se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, CA).

4.5.3 Producción de radical superóxido

La producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ se midió como un indicador de la capacidad tisular para producir ERO, usando espectrofotometría durante la reducción del ferricitocromo *c* (Drossos et al. 1995). 100 mg de cada muestra, cortados en rebanadas delgadas, se colocaron en un tubo que contenía solución amortiguadora Krebs-Henseleit (NaCl, KCl, MgSO₄, NaH₂PO₄, NaCO₃, glucosa), se adicionó 1 mL de citocromo *c* (15 mM, tipo V1 de corazón de caballo) y se procedió a incubar las muestras en un baño de agua con agitación continua a 37 °C durante 15 min. Inmediatamente después se adicionó 1 mL de N-etilmaleimida (3 mM) para detener la reacción. Los tubos fueron centrifugados a 2000 x *g* durante 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y se leyó a 550 nm. A las muestras se les volvió a adicionar solución amortiguadora Krebs-Henseleit, citocromo *c* y N-etilmaleimida, fueron nuevamente incubadas y centrifugadas y se volvió a leer la absorbancia a 550 nm; esta lectura sirvió como blanco para calcular la cantidad de $O_2^{\cdot-}$ producido, que se obtuvo dividiendo la absorbancia de la muestra menos la del blanco entre el coeficiente de extinción del citocromo *c* ($E_{550} = 21 \text{ nM/L} \cdot \text{cm}$). Los resultados se expresaron en nanomoles de $O_2^{\cdot-}$ por minuto por g de tejido húmedo.

4.5.4 Daño oxidativo

4.5.4.1 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se midió como indicador del daño oxidativo a lípidos cuantificando el contenido tisular de sustancias reactivas al ácido tiobartibúctico (TBARS) (Okhawa et al. 1979, Persky et al. 2000, Zenteno-Savín et al. 2002) tal y como se describe en la primera parte de este trabajo (3.5.5.1). Los resultados se expresaron en nanomoles de TBARS por g de tejido húmedo.

4.5.4.2 Proteínas carboniladas

El daño oxidativo a proteínas se midió cuantificando el contenido tisular de proteínas carboniladas (Levine et al. 1990, 1994) como se describe detalladamente en el apartado 3.5.5.2. La concentración de proteínas carboniladas se expresó en nanomoles de proteínas carboniladas por g de tejido húmedo.

4.5.5. Enzimas antioxidantes

4.5.5.1 Extractos tisulares

Los extractos tisulares elaborados para medir la actividad enzimática de SOD, CAT, GPx, GST y GR se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.5.4.1.

4.5.5.2 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

Se midió la actividad total de SOD (Mn-SOD + Cu,Zn-SOD) utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa como generador de $O_2^{\cdot-}$ y nitroazul de tetrazolio (NBT) como detector (Suzuki 2000). En una celda se mezclaron, la solución de trabajo (solución amortiguadora sodio-carbonato 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM,

EDTA 0.1 mM), xantina oxidasa (1 U/mL en sulfato de amonio 2 M) y 25 μ L de muestra o blanco (solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM). Se registró la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos durante 5 minutos. Se obtuvo el cambio en la absorbancia por minuto a 560 nm (ΔA_{560}) para poder calcular la actividad enzimática de SOD que fue expresada en unidades por mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la reacción entre el $O_2^{\cdot-}$ y el NBT.

4.5.5.3 Catalasa (EC 1.11.1.6)

Se midió la actividad de CAT monitoreando el decremento en la concentración de H_2O_2 a 240 nm (Aebi 1984). Se mezclaron en una celda, la solución de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, H_2O_2 10 mM) y 10 μ L de muestra; se registró la absorbancia a 240 nm cada 15 segundos y se calculó el ΔA_{240} . La actividad se obtuvo con base en el ΔA_{240} y se expresó en unidades de CAT por mg de proteína. Una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de H_2O_2 por minuto.

4.5.5.4 Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)

La actividad de la GPx selenio-dependiente se midió monitoreando el decremento continuo en la concentración de NADPH al usar H_2O_2 como sustrato (Flohé y Günzler 1984). Se mezclaron en una celda, solución amortiguadora de fosfatos (500 mM), EDTA (50 mM), azida de sodio (20 mM), glutación disulfuro reductasa (15 U/mL), NADPH (1.5 mM), glutación (250 mM), dH_2O , 50 μ L de muestra y H_2O_2 (10 mM). Se midió la absorbancia a 340 nm cada 3 s durante 40 s y se calculó el ΔA_{340} . Se corrieron simultáneamente dos blancos, uno sin H_2O_2 y otro sin muestra. La actividad

enzimática se calculó usando el coeficiente de extinción del NADPH (6.22 M/L) y se expresó en miliunidades de GPx por mg de proteína. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de NADPH por minuto.

4.5.5.5 Glutación-S-transferasa (EC 2.5.1.18)

La actividad de GST se midió monitoreando la formación del complejo tioéter-glutación-dinitrobenceno, como producto de la reacción de GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) (Habing y Jakoby 1981). Se mezclaron en una celda, solución de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, GSH 1 mM, EDTA 0.5 mM), CDNB (10 mM) y 10 μL de muestra. Se registró la absorbancia cada 30 segundos durante 6 minutos y se calculó el ΔA_{340} . Se corrió un blanco sustituyendo la muestra por solución de trabajo. Se calculó la actividad con base en el ΔA_{340} y se expresó en miliunidades de GST por mg de proteína. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que sintetiza 1 μmol de producto por minuto.

4.5.5.6 Glutación disulfuro reductasa (EC 1.6.4.2)

La actividad de GR se midió siguiendo la oxidación de NADPH por GSSG (Goldberg y Spooner 1983, Hermes-Lima y Storey 1995) tal y como se describe en la primera parte de este estudio (3.5.4.2) y se expresó en miliunidades de GR por mg de proteína. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmol de GSSG por minuto.

4.5.6 Glutación y glutación disulfuro

Se midió la concentración total de glutación ($\text{GSH-eq} = \text{GSH} + 2\text{GSSG}$), de GSH, y de GSSG siguiendo los métodos descritos por Tietze (1969) y Griffith (1980) con

modificaciones (Hermes-Lima y Storey 1993, Ramos-Vasconcelos y Hermes-Lima 2003) como se describe de manera detallada en el primer capítulo de este estudio (3.5.3). Con los datos obtenidos se calculó el estado de oxidación celular (GSSG:GSH-Eq). Los resultados fueron expresados en nanomoles de GSH-Eq, GSH o GSSG por g de tejido húmedo.

4.5.7 Proteínas solubles

La cantidad de proteínas solubles se midió utilizando un kit comercial basado en el método descrito por Bradford (1976), fue expresada en mg de proteína por mL y se usó para estandarizar los valores de actividad enzimática.

4.5.8 Análisis Estadísticos

Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Con los datos obtenidos se realizaron estadísticas descriptivas y pruebas de normalidad (Shapiro-Wilkins) y de homocedasticidad (Levene). Para detectar diferencias significativas entre especies y entre tejidos se utilizó el análisis de variancia de una vía (ANDEVA) con una prueba *a posteriori* de Bonferroni o el análisis de variancia por rangos de Kruskall-Wallis seguido de una U de Mann-Whitney, según fuera el caso (Zar 1999). Para todos los casos se consideró 95% como nivel de confianza y $\alpha < 0.1$ como tendencia no significativa. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el paquete SYSTAT[®] 11.0 (SPSS, Richmond, CA).

4.6 Resultados

4.6.1 Producción de radical superóxido

La producción endógena de $O_2^{\bullet-}$ fue significativamente más alta en el hígado de foca de casco ($p=0.014$) que en el de foca de arpa o en el de lobo marino. En el pulmón de lobo marino se registró menor producción de $O_2^{\bullet-}$ ($p=0.0001$) que en el de cualquiera de los dos fócidos. En el músculo de foca de casco también hubo mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ ($p=0.026$) que en el de lobo marino (Fig. 4).

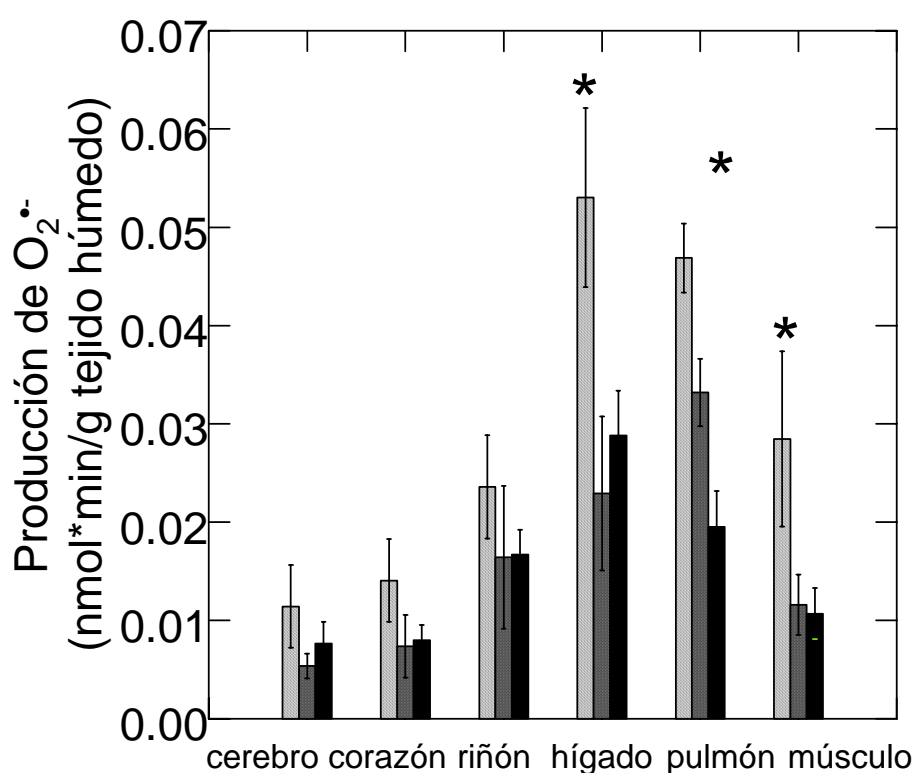


Figura 4. Producción de radical superóxido (nmol*min/g de tejido húmedo) en tejidos de foca de casco (□ n=5), foca de arpa (▨ n=4) y lobo marino de California (■ n= 10). Los resultados se presentan como media ± error estándar. *= diferencias significativas por tejido entre especies ($p<0.05$).

4.6.2 Daño oxidativo

La peroxidación de lípidos no fue estadísticamente distinta entre los tejidos de las tres especies, únicamente el riñón de foca de arpa presentó una tendencia no significativa ($p=0.074$) a tener mayores niveles de lipoperoxidación que el riñón de foca de casco o el de lobo marino (Fig. 5A). El contenido de proteínas carboniladas fue

significativamente más elevado en el cerebro de lobo marino ($p=0.039$) que en el de foca de casco o en el de foca de arpa. El hígado de foca de casco presentó una tendencia no significativa ($p=0.085$) a tener niveles más bajos de proteínas carboniladas que el hígado de foca de arpa o el hígado de lobo marino (Fig. 5B).

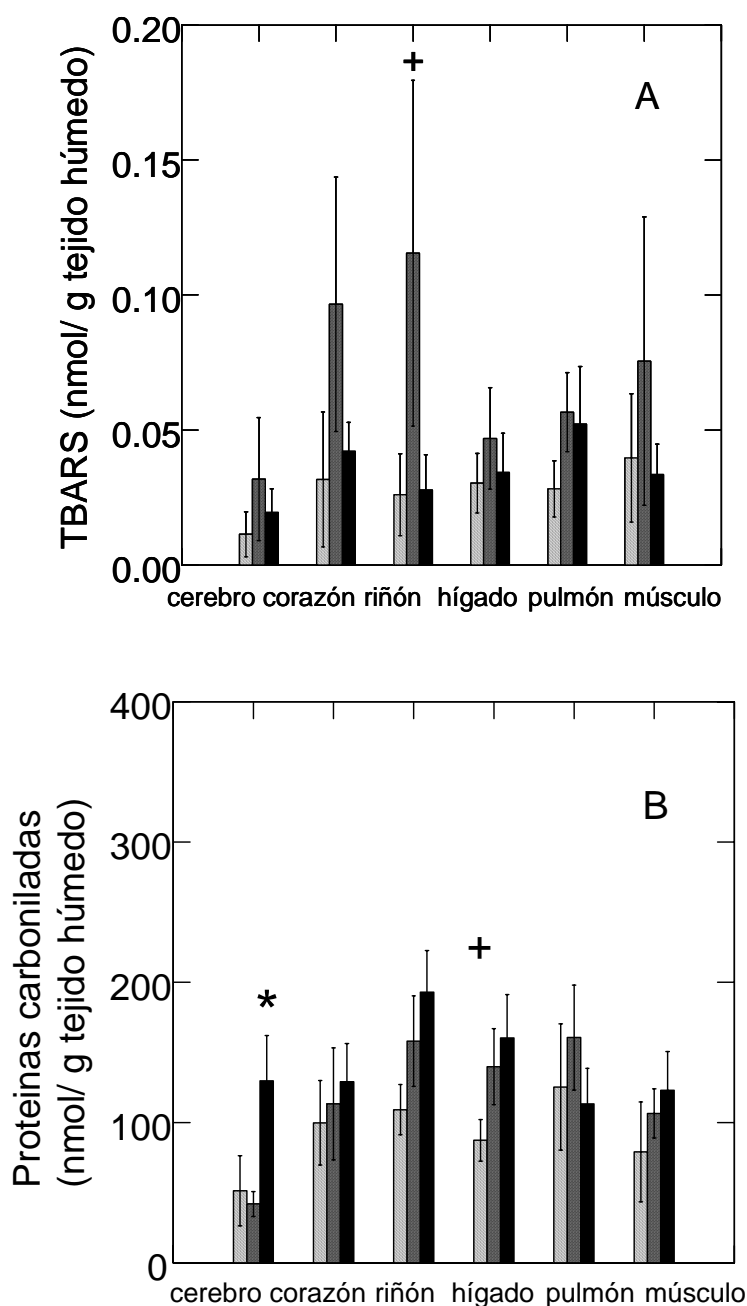


Figura 5. A: Peroxidación de lípidos (TBARS) y B: proteínas carboniladas (nmol/g de tejido húmedo) en tejidos de foca de casco (□ n=5), foca de arpa (▨ n=4) y lobo marino de California (■ n= 10). Los resultados se presentan como media \pm error estándar. *,⁺= diferencias por tejido entre especies (*= $p<0.05$, ⁺= $p<0.1$).

4.6.3 Enzimas antioxidantes

La actividad de SOD fue más alta en el cerebro de foca de arpa que en el de foca de casco o lobo marino ($p=0.048$). El músculo de foca de casco presentó menor actividad de SOD que el de foca de arpa ($p=0.030$). En el resto de los tejidos no se registraron diferencias significativas en la actividad de SOD entre especies (Fig. 6A). La actividad de CAT fue más elevada ($p<0.05$) en el cerebro, el pulmón y el músculo de lobo marino que en el de foca de casco o en el de foca de arpa y no presentó diferencias significativas entre las dos especies de fócidos en ningún tejido. Se observó una tendencia no significativa en el riñón de lobo marino ($p= 0.060$) a presentar mayor actividad de CAT que el riñón de cualquiera de los fócidos. La actividad de GPx fue más alta en el riñón ($p= 0.030$) y en el músculo ($p= 0.049$) de lobo marino que en los de los fócidos y presentó una tendencia no significativa a ser más elevada en el corazón ($p= 0.079$) y en el hígado ($p= 0.069$) de lobo marino que en el de foca de arpa (Fig. 7A). La actividad de GST fue significativamente más alta en el riñón ($p= 0.004$), el hígado ($p=0.019$) y el músculo ($p=0.005$) de lobo marino que en el cualquiera de las focas y mostró una tendencia no significativa ($p=0.096$) a ser más elevada en el cerebro de lobo marino que en el de ambos fócidos (Fig. 7B). La actividad de GR fue significativamente más elevada ($p= 0.044$) en el músculo de lobo marino que en el de foca de arpa y presentó una tendencia no significativa a ser más alta ($p=0.079$) en el corazón de lobo marino que en el de foca de casco (Fig. 7C).

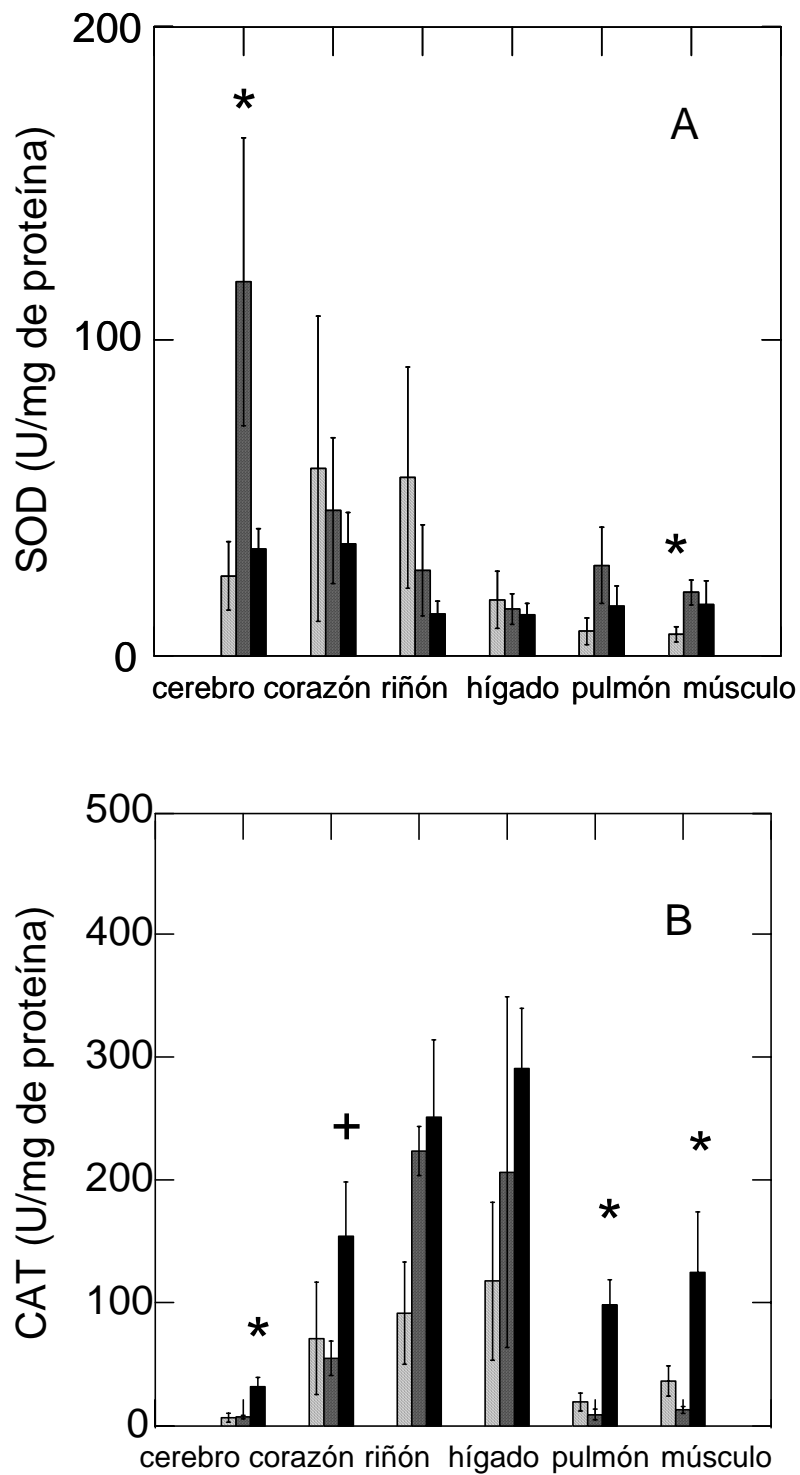


Figura 6. A: Actividad de superóxido dismutasa (SOD) y B: catalasa (CAT) en tejidos de foca de casco (□ n=5), foca de arpa (▨ n=4) y lobo marino de California (■ n= 10). Los resultados están expresados en unidades por mg de proteína y se presentan como media ± error estándar. *,+ = diferencias por tejido entre especies (*= p<0.5 + = p<0.1).

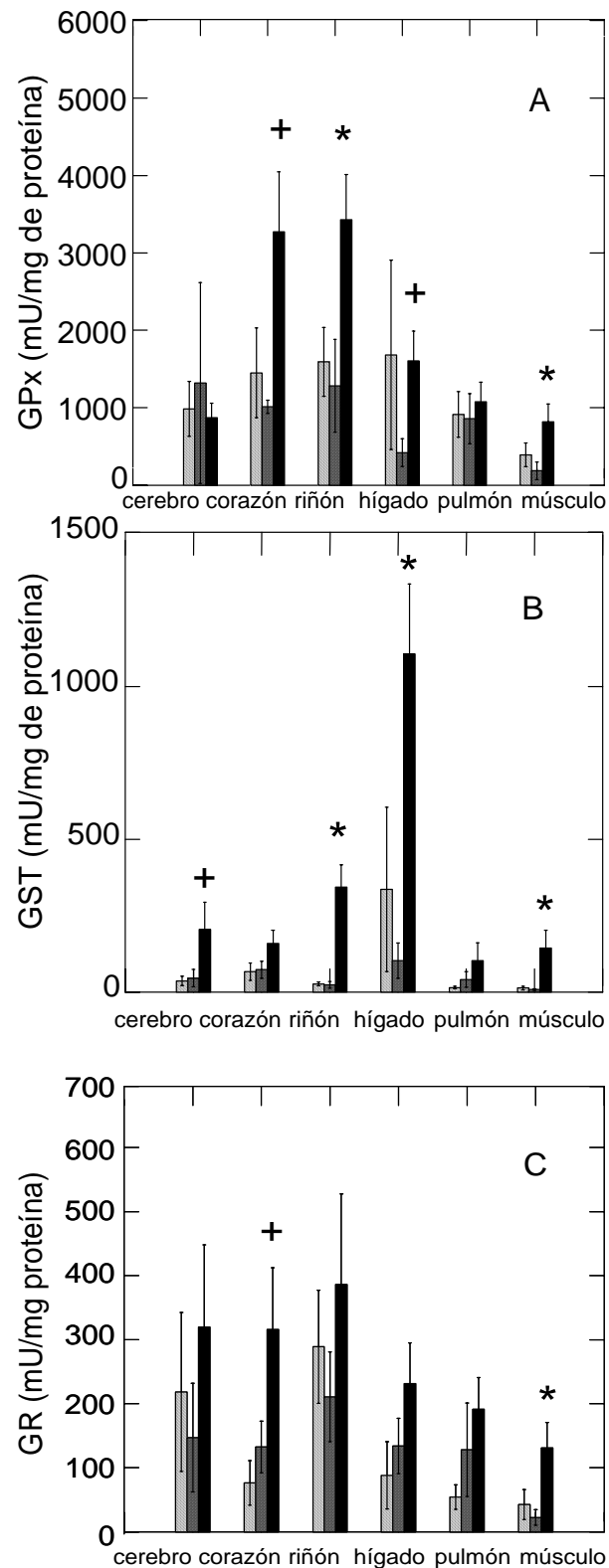


Figura 7. A: Actividad de glutatión peroxidasa (GPx), B: glutatión-S-transferasa (GST) y C: glutatión disulfuro reductasa (GR) en tejidos de foca de casco (□ n=5), foca de arpa (▨ n=4) y lobo marino de California (■ n= 10). Los resultados están expresados en miliunidades por mg de proteína y se presentan como media ± error estándar. *,+ = diferencias por tejido entre especies (*= p<0.5 + = p<0.1).

4.6.4 Glutación y glutatión disulfuro

No se registraron diferencias significativas en la concentraciones de GSH-Eq, GSH o GSSG ni en la tasa GSSG:GSH-Eq entre los tejidos de las especies estudiadas; únicamente el pulmón de los focidos mostró una tendencia no significativa ($p=0.066$) a presentar mayor cantidad de GSH-Eq que el pulmón de lobo marino (Fig. 8, Tabla 3).

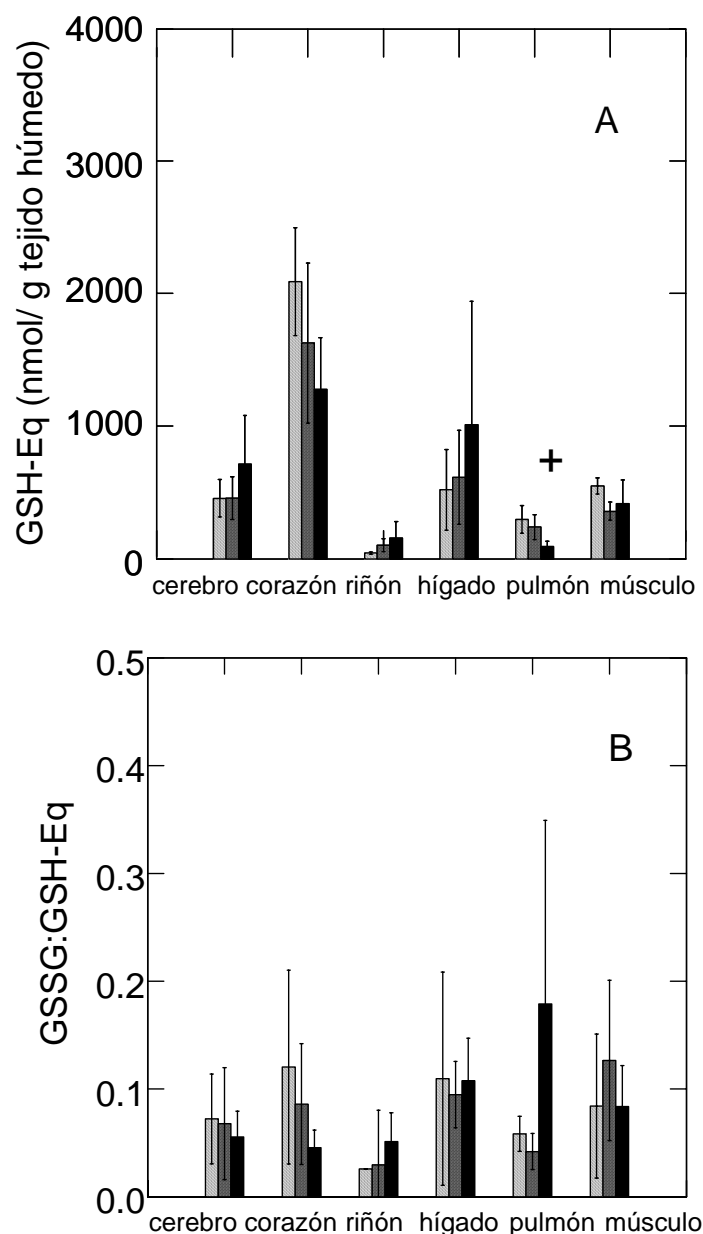


Figura 8. A: Contenido total de glutatión (GSH-Eq) en nanomoles por gramo de tejido húmedo y B: Estado de oxidación celular (GSSG:GSH-Eq) en tejidos de foca de casco (□ n=5), foca de arpa (▨ n=4) y lobo marino de California (■ n= 10). Los resultados se presentan como media \pm error estándar. + = diferencias por tejido entre especies ($p<0.1$).

Tabla-III. Concentración de glutatión (GSH) y glutatión disulfuro (GSSG) en tejidos de foca de casco (n=5), foca de arpa (n=4) y lobo marino de California (n=10).

Especie	Tejido	GSH	GSSG
		(reducido)	(oxidado)
Foca de casco	Cerebro	389.82 ± 22.03	32.63 ± 20.99
	Corazón	1696.31 ± 503.11	195.93 ± 113.37
	Riñón	47.83 ± 9.01	1.30 ± 0.05
	Hígado	485.98 ± 272.72	17.19 ± 8.81
	Pulmón	267.14 ± 89.77	15.15 ± 3.61
	Músculo	458.326 ± 82.858	45.321 ± 31.400
Foca de arpa	Cerebro	407.26 ± 145.74	25.183 ± 17.080
	Corazón	1435.07 ± 543.70	95.39 ± 34.66
	Riñón	60.474 ± 0.15	2.00 ± 1.90
	Hígado	538.54 ± 289.90	37.50 ± 9.44
	Pulmón	224.63 ± 78.88	6.65 ± 0.51
	Músculo	286.76 ± 76.71	35.65 ± 14.49
Lobo marino	Cerebro	642.01 ± 410.05	31.48 ± 14.92
	Corazón	1126.67 ± 395.72	223.72 ± 168.61
	Riñón	166.39 ± 112.68	19.99 ± 13.25
	Hígado	1211.62 ± 864.63	34.15 ± 23.05
	Pulmón	76.86 ± 58.10	76.80 ± 52.99
	Músculo	443.26 ± 200.32	77.57 ± 56.87

Los resultados están expresados en nanomoles por g de tejido húmedo y se presentan como media ± error estándar. No existen diferencias significativas por tejido entre especies.

4.7 Discusión

La producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ en los diferentes tejidos de las especies estudiadas siguió un patrón similar al reportado por Valdivia et al. (2007) para la tortuga verde (*Chelonia mydas agassizii*) un reptil que, por su condición de buceador, también está a expuesto a ciclos continuos de isquemia/reperfusión. Se registraron diferencias significativas en la producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ en el hígado, el pulmón y el músculo de las tres especies (Fig. 4). Según Burns et al. (2007) la capacidad fisiológica de buceo

de la foca de casco es mayor que la de la foca de arpa y que la del lobo marino de California (Weise y Costa 2007); estas diferencias en la capacidad para bucear (Tabla 4) probablemente se vieron reflejadas en la capacidad tisular para producir ERO ya que todos los tejidos de la foca de casco presentaron niveles mayores (aunque no significativos para el caso de cerebro, corazón y riñón) de producción de $O_2^{\cdot-}$ que los tejidos de la foca de arpa o los del lobo marino (Fig. 4).

Tabla IV. Capacidad fisiológica de buceo y capacidad tisular para producir ERO de las especies estudiadas.

Especie	Tejido	O_2	$O_2^{\cdot-}$	Referencia
Foca de casco	TBO ₂	94.0 ± 4.4	0.038 ± 0.005*	Burns et al. 2007
	Pulmón	7.4 ± 0.1	0.047 ± 0.003	Burns et al. 2007
	Músculo	37.3 ± 1.4	0.028 ± 0.008	Burns et al. 2007
Foca de arpa	TBO ₂	74.8 ± 4.6	0.028 ± 0.006*	Burns et al. 2007
	Pulmón	5.2 ± 0.16	0.033 ± 0.003	Burns et al. 2007
	Músculo	27.0 ± 1.3	0.024 ± 0.012	Burns et al. 2007
Lobo marino	TBO ₂	47.3 ± 1.1	0.017 ± 0.003*	Weise y Costa 2007
	Músculo	16.5 ± 0.2	0.024 ± 0.006	Weise y Costa 2007
	Pulmón	-	0.011 ± 0.002	Weise y Costa 2007

Los datos se presentan como media ± error estándar. O_2 = cantidad de oxígeno disponible (mL/Kg) TBO₂= concentraciones totales de oxígeno corporal (mL/Kg). $O_2^{\cdot-}$ = producción endógena de radical superóxido (nmol*min/ g tejido húmedo). *= suma de la producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ en todos los tejidos estudiados.

La mayor capacidad tisular para producir ERO observada en los tejidos de foca de casco que en los de foca de arpa o en los de lobo marino, probablemente se deriva de exposiciones más agudas a isquemia, asociadas a la duración y profundidad de los buceos que realiza esta especie. La foca de casco puede bucear a profundidades mayores a 1000 m y permanecer sumergida por periodos de hasta 52 minutos (Folkow y Blix 1999); en contraste, la foca de arpa alcanza una profundidad y un tiempo máximo de buceo de alrededor de 568 m y 25 minutos (Folkow et al. 2004), mientras que el lobo

marino de California bucea a una profundidad máxima de 275 m (Kooyman 2002) y por periodos de tiempo no mayores a los 4 min (Costa et al. 2004).

Por otra parte, se sabe que además de las adaptaciones fisiológicas como son concentraciones elevadas de oxígeno en el músculo y la sangre, volúmenes sanguíneos y hematocritos altos y contenidos de hemoglobina y mioglobina elevados, que contribuyen en conjunto a aumentar la capacidad fisiológica de buceo, y que se presentan en cantidades importantes en todas especies de fócidos que se caracterizan por realizar buceos profundos y de larga duración (Butler y Jones 1997, Kooyman y Ponganis 1998, Elsner 1999, Ramírez et al. 2007), la foca de casco posee particularidades anatómicas como mayor tamaño y mayor musculatura en el ventrículo derecho de su corazón, así como altas concentraciones de fibras de elastina y mayor diámetro en la aorta que otras focas capaces de realizar buceos profundos y prolongados; lo anterior probablemente ayuda a la foca de casco a aumentar la eficiencia del buceo al permitir la salida de un mayor volumen de flujo sanguíneo que es capaz de incrementar la perfusión hacia el pulmón después del buceo, facilitando la normalización del ritmo cardíaco y la reoxigenación de los tejidos durante el periodo de recuperación en la superficie (Draberk y Burns 2002). Sin embargo, estas adaptaciones anatómicas que, por un lado ayudan a la foca de casco a aumentar su capacidad de buceo, por el otro podrían incrementar la generación de ERO en el pulmón durante la reperusión. El tejido pulmonar de la foca de casco fue uno de los que presentó mayor producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ de entre todos los tejidos estudiados. Como dato interesante resalta que únicamente se obtuvieron diferencias significativas en este parámetro con el pulmón de lobo marino y no con el de la foca de arpa (Fig.4). A la fecha no existen estudios que describan detalladamente la anatomía del sistema cardio-

respiratorio de la foca de arpa y que puedan servir como base para ayudar a explicar las similitudes en la producción de $O_2^{\bullet-}$ con la foca de casco.

Se sabe que en general, los pulmones de los fócidos son uno de los órganos más expuestos a ciclos agudos de isquemia/reperfusión durante y después del buceo debido por una parte, a la activación de receptores periféricos y arteriales que permiten que éstos se desinflen y colapsen para ayudar al descenso y evitar barotraumas y por la otra, a que son el primer tejido en recibir la reperfusión al final del buceo (Falke et al. 1985, Kooyman y Ponganis 1998, Elsner 1999). Tanto el pulmón de la foca de casco como el de la foca de arpa presentaron niveles mayores en la producción de $O_2^{\bullet-}$ que el pulmón de lobo marino (Fig. 4) que, sin embargo, no se vieron reflejados ni en mayor daño oxidativo a lípidos y proteínas (Fig. 5) ni en mayor estado de oxidación celular (Fig. 8B), pese a que tampoco se registró mayor actividad de ninguna de las enzimas antioxidantes (Figs. 6 y 7) en estos tejidos. El único parámetro en el se que registraron diferencias, aunque no significativas ($p=0.066$), en el tejido pulmonar a favor de ambos fócidos, fue la concentración de GSH-Eq (Fig. 8A); es posible que niveles mayores de GSH-Eq en el pulmón de los fócidos que en el de lobo marino ayuden a balancear de manera eficiente la producción de $O_2^{\bullet-}$ evitando el daño oxidativo (Fig. 5). Los resultados del primer capítulo de este trabajo sugieren la participación activa del sistema del GSH como mecanismo protector contra la isquemia/reperfusión asociada al buceo en tejidos de fócidos.

Pese que no se registraron diferencias significativas en la actividad de GR (Fig. 7C), de GST o GPx (Figs. 7A y 7B) que pudieran evidenciar que existe mayor tasa de reciclamiento o mayor uso del GSH en el pulmón de los fócidos que en el de lobo marino, si se registraron mayores concentraciones de GSH-Eq. Lo anterior puede deberse más que a una diferencia en el reciclamiento y el mantenimiento del péptido,

como sucede en los fócidos con respecto a los mamíferos no buceadores (ver sección 3.7, Vázquez-Medina et al. 2006), a que existe una mayor actividad de las enzimas encargadas de la síntesis *de novo* de este compuesto (Kosower y Kosower 1978, Meister y Anderson 1983) en el pulmón de los fócidos estudiados que en el del lobo marino de California.

Por otra parte, es importante volver a resaltar que en el pulmón de los fócidos existe mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ que en el de lobo marino que, pese a no ser contrarrestada por una actividad más alta de la SOD (Fig. 6A), aparentemente no repercute en el daño oxidativo (Fig. 5). Vázquez-Medina et al. (2006) encontraron mayor actividad de las enzimas SOD y GPx en pulmones de foca anillada que en pulmones de cerdo, lo que da idea de que en realidad existe protección enzimática antioxidante en este tejido contra la producción post-buceo de $O_2^{\bullet-}$ en los pinnípedos y probablemente en otros vertebrados buceadores. Pese a lo anterior, las diferencias encontradas en la producción de $O_2^{\bullet-}$ a nivel familia (focas y lobos marinos) podrían deberse a la capacidad de buceo, es decir, al grado de isquemia/reperfusión al que están sometidos los fócidos en comparación con los otáridos debido a sus buceos más prolongados y profundos (Folkow y Blix 1999, Kooyman 2002, Folkow et al. 2004, Costa et al. 2004), y/o a la probable utilización del $O_2^{\bullet-}$ en la activación de otros mecanismos que podrían ayudar a prevenir el daño oxidativo derivado de periodos de isquemia prolongados seguidos de una reperfusión abrupta, como los que experimentan los fócidos en respuesta a los buceos que realizan (Elsner et al. 1966).

Buetler et al. (2004) refuerza la idea anterior al señalar que el $O_2^{\bullet-}$ es una molécula importante como mecanismo de señalización celular. Haddad y Land (2001), Haddad (2002a, 2002b, 2002c, 2002d) y Haddad y Harb (2005) proponen que la activación no hipóxica del HIF-1 en el tejido pulmonar de mamíferos es mediada tanto

por ERO como por GSH, péptido cuyas concentraciones también fueron más altas en el pulmón de los fócidos que en el del lobo marino (Fig. 8A). Del mismo modo, Johnson et al. (2004, 2005) encontraron mayores niveles de HIF-1 α , HIF-1 β y de la proteína de von Hippel–Lindau (pVHL) en el pulmón que en el corazón, riñón, hígado o músculo de focas anilladas. La pVHL es una proteína que en condiciones de normoxia se une al HIF-1 α , cuyos residuos de prolina y asparagina son continuamente hidroxilados, promoviendo su ubiquitinación para su posterior degradación en el proteosoma (Salceda y Caro 1997) y, que en condiciones de hipoxia no es capaz de interactuar con el HIF-1 α debido a la ausencia de hidroxilación en esta proteína, promoviendo la unión del HIF-1 α con el HIF-1 β , la formación del complejo HIF-1 y su translocación al núcleo celular (Maxwell et al. 1999, Jaakkola et al. 2001). La alta acumulación del HIF-1 α en el pulmón de focas a pesar de la presencia también alta de la pVHL sugiere que en este tejido existe una activación no hipóxica del HIF-1, posiblemente mediada por ERO y GSH (Haddad y Land 2001, Haddad 2002a, 2002b, 2002c, 2002d, Haddad y Harb 2005) que probablemente ayuda a activar otros mecanismos protectores contra la isquemia/reperfusión y a recuperar la función pulmonar después del buceo (Johnson et al. 2005).

Otro componente importante de los pulmones de los pinnípedos, además del reforzamiento cartilaginoso y del tejido conectivo que permite altas tasas de inspiración y expiración y el inflamamiento/desinflamamiento repetitivo de los alvéolos durante y después de una apnea, es la presencia de músculo liso en las paredes pulmonares (Kooyman 1989). Esta presencia de tejido muscular liso podría acarrear producción de ERO debido a que la vasoconstricción periférica en este tejido se mantiene drásticamente durante todo el buceo (Elsner 1999).

Zenteno-Savín y Elsner (2000) y Zenteno-Savín et al. (2002) encontraron mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en músculo que en riñón y corazón de focas y de cerdos; el mismo patrón se observó en este estudio en los tejidos de la foca de casco, cuyo tejido muscular registró mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ que el de la foca de arpa y el de lobo marino (Fig. 4). Las diferencias en la producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ en el tejido muscular pueden estar relacionadas con diferencias específicas en la capacidad fisiológica de buceo de las tres especies (Tabla 4). Mientras que las concentraciones de O_2 en el pulmón de las dos especies de fócidos difieren únicamente en 2.2 mL/Kg, las diferencias en dicho parámetro en el músculo son de 10.3 mL/Kg entre ambas focas y de 20.8 mL/Kg entre la foca de casco y el lobo marino. Estas diferencias en la cantidad de oxígeno en los músculos están dadas principalmente por mayor volumen sanguíneo, mayor porcentaje de hematocrito y mayor concentración de hemoglobina y mioglobina en el músculo de la foca de casco que en el de la foca de arpa (Burns et al. 2007) o el lobo marino (Weise y Costa 2007). Está ampliamente documentado que los fócidos poseen niveles de hematocrito y relaciones volumen sanguíneo/masa corporal elevados que les permiten extender el uso del metabolismo aerobio y bucear por periodos de tiempo prolongados (Lenfant 1969, Qvist et al. 1986, Castellini et al. 1988, Castellini y Castellini 1993, Elsner 1999) y que éstos tienden a incrementarse en especies con mayor capacidad fisiológica de buceo (Burns et al. 2007); del mismo modo, bucear por más tiempo y a mayor profundidad implica ajustes cardiovasculares más agudos y por lo tanto mayor isquemia selectiva (Elsner 1999) que pudiera estarse reflejando en las diferencias post-buceo en la producción de ERO en el músculo de ambos fócidos (Fig. 4).

Se sabe que la fuente principal de $O_2^{\cdot-}$ en las células *in vivo* es la cadena de transporte de electrones (Halliwell y Gutteridge 1999) y que la media de la densidad mitocondrial por volumen de fibra en el músculo de la foca común, capaz de bucear a

profundidades de hasta 280 m y por periodos de tiempo cercanos a la media hora (Kooyman 2002), es de 9.7%, mientras que en el de lobo marino de Steller es de 6.2% (Kanatous et al. 1999). Por lo tanto es probable que la mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ encontrada en el músculo de la foca de casco que en el de lobo marino de California se deba también a que existe mayor densidad mitocondrial en el tejido muscular de esta especie.

Otra posibilidad es que los lobos marinos eviten la producción de ERO en el músculo y en el resto de sus tejidos (Fig.4) induciendo mecanismos como la actividad de la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) (Elsner et al. 1995, 1998) que se encarga del reciclamiento de nucleótidos purínicos acumulados durante la isquemia debido a la degradación del ATP (Kuppusamy y Zweier 1989, Thompson-Gorman y Zweier 1990). En condiciones normales esta vía metabólica es la responsable de la generación del 90% de los nucleótidos de purina y de la remoción de la mayoría de la HX producida durante el metabolismo de las purinas al convertirla en ATP vía inosín mono fosfato (IMP) (Stone y Simmonds 1991). Durante el desabasto de oxígeno, como sucede en los tejidos isquémicos, la degradación de nucleótidos purínicos es más rápida y genera mayor acumulación HX que, junto con la conversión proteolítica de la XDH en XO, resulta en la producción abrupta de ERO durante la reperfusión (McCord 1985). La remoción de la HX acumulada durante la isquemia por la HGPRT podría ser un mecanismo eficiente para evitar la producción de $O_2^{\cdot-}$ en tejidos de lobo marino y al mismo tiempo, conservar las reservas energéticas derivadas de las purinas, sobre todo del ATP, mediante la vía de HX-IMP catalizada por la HGPRT. Lo anterior, además de evitar los problemas derivados de la toxicidad de las ERO en tejidos de lobo marino, representaría una alternativa para reducir el alto costo metabólico de producir ATP *de novo* al proveer energía metabólica intermediaria (Elsner et al. 1998).

El hígado de la foca de casco fue otro tejido que, al igual que el músculo, presentó mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ que el de la foca de arpa o el del lobo marino (Fig. 4). Igual que en el músculo, estas diferencias en la producción de $O_2^{\bullet-}$ tampoco se vieron reflejadas en mayor daño oxidativo a lípidos o proteínas (Fig. 5) pese a que no se observó mayor actividad de ninguna de las enzimas antioxidantes analizadas (Figs. 6, 7) ni mayor contenido de GSH-Eq (Fig. 8A). El hígado de la foca de casco fue además el tejido que presentó mayor producción $O_2^{\bullet-}$ de todos los tejidos estudiados. Valdivia et al. (2007) también encontraron mayor producción de $O_2^{\bullet-}$ en el hígado que en el corazón, riñón, pulmón y músculo de la tortuga verde (*Ch. mydas agassizii*).

El hígado de los fócidos es uno de los tejidos que se ven más fuertemente vasoconstrinidos durante el buceo (Elsner et al., 1966), como sucede en otros órganos periféricos, la cantidad de flujo sanguíneo que es dirigida al tejido hepático durante un buceo es de apenas el 10% de la cantidad que recibe durante periodos de reposo (Castellini 1985), lo que provoca que la cadena de transporte de electrones prácticamente se detenga mientras el animal está buceando (Hochachka et al. 1988). Por otro lado, se sabe que durante periodos de oxigenación normales, la tasa metabólica del hígado de los mamíferos es una de las más altas (Schmidt-Nielsen 2001). Todo lo anterior podría incrementar la producción post-buceo de $O_2^{\bullet-}$, que tendría que ser contrarrestada por mecanismos antioxidantes para evitar el daño oxidativo y la pérdida de la función tisular. Sin embargo, el hígado de los fócidos no presenta mayor actividad de SOD, GPx o GST (Vázquez-Medina et al. 2006) ni mayor concentración de GSH (Fig. 1A) que el hígado de mamíferos no buceadores, lo que podría sugerir que son otros mecanismos, posiblemente antioxidantes vitamínicos o sistemas de reparación del daño generado por ERO (Zenteno-Savín 2002), los que ayudan a prevenir el daño oxidativo (Fig. 3). Otra posibilidad es que las ERO producidas en el hígado de los

fócidos, como consecuencia de la isquemia/reperfusión asociada al buceo, sean usadas como moléculas de señalización para la activación de otros mecanismos mediadores de la respuesta celular a la hipoxia (Webster 2007).

Los resultados de este trabajo, pese a haber mostrado mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en el hígado de la foca de casco que en el de la foca de arpa y en el del lobo marino (Fig. 4), que probablemente se deba a las implicaciones metabólicas que permiten a esta especie realizar buceos largos y profundos, no registraron diferencias significativas en la actividad enzimática antioxidante, la concentración de GSH (Fig. 8A, Tabla 3), el daño oxidativo (Fig. 5) o el estado de oxidación celular (Fig. 8B) entre las tres especies (Figs. 6, 7A, 7C). Únicamente el hígado del lobo marino presentó mayor actividad de GST que el de ambos fócidos (Fig. 7B). Ésta es una situación análoga a la observada en las comparaciones entre fócidos y mamíferos no buceadores (Vázquez-Medina et al. 2006).

El hígado es un órgano primordial para el almacenamiento de la GST, además de ser el tejido que presenta el mayor número de isoformas y la mayor actividad de esta enzima (Stegeman et al. 1992, Tsuchida y Sato 1992). La GST es una enzima que participa en reacciones de destoxificación de segundo nivel al conjugar agentes electrofílicos con GSH para facilitar su remoción (Habing y Jakoby 1981). Los pinnípedos y otros vertebrados buceadores acumulan hierro en el hígado (Watanabe et al. 2002, Franzellitti et al. 2004), por lo que mantener actividades elevadas de GST podrían contribuir a evitar el daño oxidativo ocasionado por metales pesados (Halliwell y Gutteridge 1999). Mayor actividad de GST en el hígado de lobo marino que en el de cualquiera de los dos fócidos (Fig. 7B) puede deberse a la presencia de grandes concentraciones de metales pesados, aparentemente de origen natural, encontrados por Sañudo-Wilhelmy y Russell (1998) y por Muñoz-Barbosa (2004) a lo largo de la

Península de Baja California y en tejidos de varias especies de tortugas (Gardner et al. 2006) y de ballenas grises (Méndez et al. 2002) del área.

No se registraron diferencias significativas en la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 4), el daño oxidativo a lípidos (Fig. 5B), la actividad de GPx, GST o GR (Fig. 7), la cantidad de GSH-Eq, GSH y GSSG o el estado de oxidación celular (Fig. 8, Tabla 3) en el riñón, el corazón o el cerebro de las especies estudiadas.

El riñón de las focas es uno de los tejidos más tolerantes a la isquemia (Behrisch y Elsner 1980), y se ve duramente vasoconstruido durante el buceo (Elsner et al. 1966) al recibir apenas cerca del 10% del volumen regular del flujo sanguíneo (Castellini 1985). A pesar de lo anterior, aparentemente no existe una pérdida de la función renal durante la reperfusión, en contraste con lo que sucede en riñones de mamíferos terrestres (Halasz et al. 1974). Al parecer, la disminución de la tasa metabólica durante el buceo en este tejido es la clave para sobrevivir a la isquemia aguda (Castellini 1985). Existe evidencia de que, pese a mantenerse en condiciones hipometabólicas durante el buceo, el riñón de las focas acumula HX (Elsner et al. 1995, Elsner et al. 1998) y tiene mayor capacidad para producir ERO, pero también mayor capacidad antioxidante total que el riñón de los mamíferos terrestres (Zenteno-Savín et al. 2002).

Pese a que no es posible argumentar que en el riñón de las focas la actividad enzimática antioxidante contribuye a aumentar la capacidad antioxidante total (Vázquez-Medina et al. 2002), los resultados de la primera parte de este estudio (Fig. 1A) permiten inferir que son antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular, como el GSH (ver sección 3.7) los que influyen de manera significativa en el estado antioxidante del riñón de las focas. Al no haber detectado diferencias significativas en los parámetros medidos entre los riñones de las tres especies estudiadas y tomando en cuenta que tanto los riñones de los fócidos como los de los otáridos se encuentran

fuertemente vasoconstrinidos, isquémicos e hipometabólicos durante el buceo (Elsner 1999), es posible suponer que en ambas familias, niveles constitutivamente elevados de GSH (ver sección 3.7) podrían determinar la alta capacidad antioxidante total encontrada por Zenteno-Savín et al. (2002) en este tejido.

El no encontrar diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos entre los corazones de las tres especies ayuda a sustentar la hipótesis del acondicionamiento natural del corazón de los mamíferos buceadores, derivado del flujo sanguíneo intermitente al que están expuestos durante el buceo, que a su vez resulta en la disminución del consumo de oxígeno necesario para mantener la función cardíaca (Gooden y Elsner 1985, Elsner 1999). Lo anterior al parecer promueve incrementos en la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Zenteno-Savín y Elsner 1998, 2000, Zenteno-Savín et al. 2002) que, a su vez, podrían inducir la respuesta enzimática antioxidante (Elsner et al. 1998, Vázquez-Medina et al. 2006), el sistema del GSH (ver capítulo 1) y probablemente la acumulación del HIF-1 (Johnson et al. 2004, Johnson et al. 2005) que, además de coordinar la respuesta homeostática a la hipoxia regulando la expresión de genes vasculares, del metabolismo energético y del ciclo celular (Bunn y Poyton 1996), podría regular la respuesta mediada por las HSPs (Date et al. 2005, Baird et al. 2006).

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos, salvo en la actividad de SOD y en la concentración de proteínas carboniladas en el cerebro de las tres especies. Los ajustes del sistema cardiovascular que sufren los pinnípedos durante el buceo tienen como fin primario mantener el flujo continuo de sangre oxigenada hacia el cerebro (Kooyman y Ponganis 1998, Elsner 1999) por lo que era de esperarse que no existieran altas tasas de producción de $O_2^{\cdot-}$ derivadas de la isquemia/reperfusión, debido a que este tejido se mantiene adecuadamente oxigenado durante todo el buceo (Hochachka et al. 1977, Hochachka 1981). A pesar de lo anterior,

existen evidencias que indican que el cerebro de ciertos fócidos, capaces de realizar buceos prolongados y profundos, tiene una especial tolerancia a concentraciones bajas de oxígeno (Elsner et al. 1970, Kerem y Elsner 1973). Dentro de esta tolerancia bien pudieran estar incluidos mecanismos de defensa antioxidantes, como la alta actividad de SOD encontrada en el cerebro de la foca de arpa (Fig. 6A).

Por otro lado, según Dromer et al. (1977), la perfusión hacia el cerebro del lobo marino de California es mantenida a niveles constantes durante todo el buceo, lo que concuerda con los valores relativamente bajos de $O_2^{\cdot-}$ y peroxidación lipídica encontrados; sin embargo, en el cerebro de lobo marino se observó mayor actividad de CAT y GST (no significativa) y mayor concentración de proteínas carboniladas que en el de los fócidos (Figs. 5B, 6B). Lo anterior podría deberse a la presencia de ácido domoico proveniente de proliferaciones microalgales nocivas que recurrentemente se presentan a lo largo de la Península de Baja California y cuyos efectos en la fauna marina silvestre han sido monitoreados desde hace más o menos 10 años (Sierra-Beltrán et al. 1997). Silvagni et al. (2005) mencionan que los efectos adversos del ácido domoico en el lobo marino de California incluyen isquemia y necrosis neuronal que bien podrían estar tratando de ser contrarrestadas por actividad de CAT y GST, y estarse viendo reflejadas en mayor contenido de proteínas carboniladas en el cerebro de lobo marino que en el de los fócidos.

El no encontrar diferencias significativas en el daño oxidativo a lípidos y proteínas (salvo en el caso del cerebro) y en el estado de oxidación celular entre los tejidos de las especies estudiadas, a pesar de las diferencias en la capacidad para producir ERO, da idea de que los pinnípedos, al igual que otros vertebrados buceadores, se preparan anticipadamente contra el estrés oxidativo derivado de la producción post-buceo de ERO, para poder sobrevivir a los ciclos continuos de isquemia/reperfusión

asociados a la respuesta al buceo (Zenteno-Savín et al. 2002, Hermes-Lima y Zenteno-Savín 2002, Bickler 2004, Willmore y Storey 2005, Vázquez-Medina et al. 2006, Valdivia et al. 2007, Furtado-Filho et al. 2007, Ramírez et al. 2007) manteniendo la actividad enzimática antioxidante y los niveles de GSH constitutivamente elevados (Wilhem-Filho et al. 2002, Vázquez-Medina et al. 2006, ver capítulo 1) y probablemente, activando el HIF-1 mediante reacciones de óxido-reducción que involucran ERO y GSH (Johnson et al. 2004, 2005), tal y como sucede en peces expuestos a cambios metabólicos en la concentración de oxígeno por exposiciones al frío y al calor (Heise et al. 2006a,b, en prensa).

Los resultados obtenidos en este trabajo también sugieren que es probable que existan ciertas diferencias a nivel familia en los mecanismos adaptativos que permiten a focas y lobos marinos tolerar la isquemia/reperfusión asociada al buceo. Mientras que las focas podrían usar el GSH y las ERO, producidas en grandes cantidades como respuesta a la isquemia aguda, para activar mecanismos que coordinen la respuesta celular a la hipoxia (Zenteno-Savín y Elsner 1998, 2000, Zenteno-Savín et al. 2002, Johnson et al. 2004, 2005, Vázquez-Medina et al. 2006, ver sección 3.7), los lobos marinos podrían evitar la producción de ERO mediante la activación de la vía HX-IMP catalizada por la HGPRT, disminuyendo los problemas derivados de la reactividad de las ERO y ayudando a generar energía metabólica intermediaria de bajo costo (Elsner et al. 1998).

En resumen, los resultados de este estudio muestran que existe mayor producción de radical superóxido en los tejidos de las especies con mayor capacidad de buceo, lo que probablemente sea el resultado de la isquemia aguda derivada de sus buceos largos y profundos. Dichas diferencias sin embargo, no se reflejan en mayor daño oxidativo a pesar de no existir, aparentemente, mayor actividad enzimática

antioxidante, ni mayor concentración de GSH, por lo que se sugiere que las tres especies de pinnípedos, independientemente de su capacidad fisiológica de buceo, poseen un sistema antioxidante altamente desarrollado y están preparadas para tolerar la producción post-buceo de ERO derivada de la isquemia/reperfusión. Por último, los resultados en su conjunto muestran que es probable que existan mecanismos adaptativos distintos a nivel familia para contrarrestar esta paradoja fisiológica; mientras que en los fócidos, la producción de ERO y el contenido de GSH podrían jugar un papel importante en la activación de otros mecanismos reguladores de la respuesta a la hipoxia, preparando a los tejidos anticipadamente para tolerar la producción de ERO y el estrés oxidativo derivado de la respuesta al buceo, en los otáridos, la producción de ERO podría estar siendo evitada mediante el reciclamiento de HX.

4.8 Conclusiones

Existen diferencias significativas en la producción de $O_2^{\bullet-}$ entre los tejidos de las especies estudiadas que aparentemente se deben a la capacidad fisiológica de buceo de cada especie.

El no encontrar, en general, diferencias significativas en el daño oxidativo, la actividad enzimática antioxidante o la concentración de GSH en los tejidos de las especies estudiadas, sugiere que tanto fócidos como otáridos tienen un sistema antioxidante altamente desarrollado que les permite estar preparados para contrarrestar la isquemia/reperfusión asociada al buceo.

Por último, es probable que existan diferencias a nivel familia en los mecanismos adaptativos que permiten a las focas y a los lobos marinos tolerar ciclos repetitivos de isquemia/reperfusión derivados de la respuesta al buceo.

5. Perspectivas

Después de analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo, es necesario seguir estudiando los mecanismos adaptativos que permiten a focas y lobos marinos contrarrestar la isquemia/reperfusión asociada al buceo. Estudios *in vitro* darían una idea cercana de la activación no hipóxica del HIF-1 mediada por GSH y por ERO en tejidos de focas, además de la participación del HIF-1 en la activación del Hsf.

Por otra parte, estudiar las concentraciones de HX y la actividad de la HGPRT en tejidos de focas y lobos marinos ayudaría a sustentar la idea de las diferencias en los mecanismos adaptativos que existen en ambas familias para sobrevivir a la isquemia/reperfusión derivada de la respuesta al buceo.

Otro punto interesante es aquel que involucra el envejecimiento en estas especies, debido a que la teoría del envejecimiento por radicales libres (Harman 1956) sigue siendo una de las más aceptadas (Harman 2006) y que, al parecer, los pinnípedos tienen cantidades importantes de antioxidantes en su sistema como consecuencia de los mecanismos adaptativos derivados de la respuesta al buceo, lo que les conferiría cierta capacidad para evitar el deterioro derivado de la edad.

6. Referencias

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Agani F H, Puchowicz M, Chavez J C, Pichiule P, LaManna J. 2002. Role of nitric oxide in the regulation of HIF-1 α expression during hypoxia. *Am. J. Physiol.* 283, C178-186.
- Ahmad S, White C W, Chang L Y, Schneider, B.K., Allen, C.B. 2001. Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.* 280, L779-L791.
- Arrigo A. 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 936-944.
- Baird N A, Turnbull D W, Johnson E A. 2006. Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 281, 38675-38681.
- Barroso J B, Peragon J, Contreras-Jurado C, Garcia-Salguero L, Corpas F J, Esteban F. J, Peinado M A, De La Higuera M, Lupianez J A. 1998. Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. *Am. J. Physiol.* 274, R1578-1587.
- Behrisch H W, Elsner R. 1980. Molecular adaptations to the diving habit: on the possible role of glycerol in the ischemic seal kidney. *Comp. Biochem. Physiol.* 66 B, 403-407.
- Bickler P E. 2004. Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms. *J. Exp. Biol.* 207, 3243-3249.
- Bowen W D, Boness D J, Oftedal O T. 1987. Mass transfer from mother to pup and subsequent mass loss by the weaned pup in the hooded seal, *Cystophora cristata*. *Can. J. Zool.* 65, 1-8.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bunn H F, Poyton O R. 1996. Oxygen sensing and the molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.* 76: 839-885.
- Burns J M, Lestyk K C, Folkow L P, Hammill M O, Blix A S. 2007. Size and distribution of oxygen stores in harp and hooded seals from birth to maturity. *J. Comp. Physiol B* 177, 687-700.
- Butler P J, Jones D R. 1997. Physiology of diving of birds and mammals. *Physiol. Rev.* 77:837-899
- Buetler Krauskopf A, Ruegg U T. 2004. Role of superoxide as a signaling molecule. *News. Physiol. Sci.* 19, 120-123.
- Castellini M A. 1985. Metabolic depression in tissues and organs of marine mammals during diving: living longer with less oxygen. *Mol. Physiol.* 8, 427-437.
- Castellini M A, Davis R W, Kooyman G L. 1988. Blood chemistry regulation during repetitive diving in Wedell seals. *Physiol. Zool.* 61, 379-386.
- Castellini J M, Castellini M A. 1993. Estimation of splenic volume and its relationship to long-duration apnea in seals. *Physiol. Zool.* 66, 619-627.
- Costa D P, Gales N J, Goebel M E. 2001. Aerobic Dive Limit: How often does it Occur in Nature? *Comp. Biochem. Physiol.* 129A, 771-783.
- Costa D P, Kuhn C E, Weise M J, Shaffer S A, Arnould J P Y. 2004. When does physiology limit the foraging behaviour of freely diving mammals? *Int. Congr. Ser.* 1275, 359-366.
- Date T, Mochizuki S, Belanger A J, Yamakawa M, Luo Z, Vincent K A, Cheng S H, Gregory R J, Jiang C. 2005. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1 α protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 288: C314-C320.

- Davis R W, Kanatous S B. 1999. Connective oxygen transport and tissue oxygen consumption in Wedell seals during aerobic dives. *J. Exp. Biol.* 202, 1091–1113.
- Debier C, Pomeroy P P, Baret P V, Mignolet E, Larondelle Y. 2002. Vitamin E status and the dynamics of its transfer between mother and pup during lactation in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Can. J. Zool.* 80, 727-737.
- Del Corso A, Vilardo P G, Cappiello M, Cecconi I, Dal Monte M, Barsacchi D, Mura U. 2002. Physiological thiols as promoters of glutathione oxidation and modifying agents in protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 392-398.
- Draberk C M, Burns J M. 2002. Heart and aorta morphology of the deep-diving hooded seal (*Cystophora cristata*) *Can. J. Zool.* 80, 230-2036.
- Dromer K J, Denn M J, Stone H L. 1977. Cerebral blood flow in the sea lion (*Zalophus californianus*) during dives. *Comp. Biochem. Physiol.* 58A, 11-18.
- Drossos G, Lazou P, Panagopoulos P, Westaby S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* 59, 169–172.
- Elsner R, Gooden B A. 1983. Diving and asphyxia. A comparative study of animals and man. *Monographs of Physiological Society* 140: 1-168
- Elsner R. 1999. Living in water: solutions to physiological problems. En: Reynolds III, J E, Rommel S A (Eds.). *Biology of Marine Mammals*. Smithsonian Institution Press. Washington D.C. pp. 73–116.
- Elsner R, Franklin D L, Van Citters R L, Kenney D. W. 1966. Cardiovascular defense against asphyxia. *Science* 153, 941-949.
- Elsner R, Shurley J T, Hammond D D, Brooks R E. 1970. Cerebral resistance to hypoxemia in asphyxiated Wedell seals. *Resp. Physiol.* 9, 287-297.
- Elsner R, Øyasaeter S, Saugstad O L, Scytte-Blix A. 1995. Seal adaptations for long dives: recent studies of ischemia and oxygen radicals. En: Blix A, Walloe, S L, Ultang O (Eds.). *Developments in Marine Biology, Whales, Seals, Fish and Man. International Symposium on the Biology or Marine Mammals in the North East Atlantic*. Tromso, Norway, 1994, vol. 4. Elsevier Science B.V, Amsterdam. pp. 371–376.
- Elsner R, Øyasaeter S, Almaas R, Saugstad O L. 1998. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 975–980.
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 18, 1905-1914.
- Engelhardt F R, Geraci J R, Walter B L. 1975. Tocopherol distribution in the harp seal *Pagophilus groenlandicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 52B, 561-562.
- Flohé LA, Günzler WA. 1984. Assays for glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 114–120.
- Falke K, Hill R D, Qvist J, Schneider R C, Guppy M, Liggins GC, Hochachka P W, Elliott R E, Zapol W M. 1985. Seal lungs collapse during free diving: evidence from arterial nitrogen tensions. *Science* 229, 556– 558.
- Folkow, L.P., Blix, A.S. 1999. Diving behaviour of hooded seals (*Cystophora cristata*) in the Greenland and Norwegian seas. *Polar Biol.* 22: 61–74.
- Folkow, L.P., Nordøy E S, Blix, A.S. 2004. Distribution and diving behaviour of harp seals (*Pagophilus groenlandicus*) from the Greenland Sea stock. *J. Comp. Physiol. B* 27, 281-298.

- Franzellitti S, Locatelli C, Gerosa G, Vallini C, Fabbri E. 2004. Heavy metals in tissues of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the northwestern Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol.* 138C, 187-194.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203-1209.
- Fujii T, Hamaoka R, Fujii J, Taniguchi N. 2000. Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 123-130.
- Furtado-Filho O V, Polcheira C, Machado D P, Mourão G, Hermes-Lima M. Selected oxidative stress markers in a South American crocodilian species. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C, 241-254.
- Gardner S C, Fitzgerald SL, Acosta-Vargas B, Méndez L. 2006. Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from Baja California peninsula, Mexico. *BioMetals* 19, 91-99.
- Ghebremeskel K, Williams G. 1988. Plasma retinol and alpha-tocopherol levels in captive and wild animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B, 279-283.
- Goldberg D M, Spooner R J. 1983. Glutathione reductase. En: Bergmeyer H U (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Nueva York. Pp. 258-265.
- Gooden B A, Elsner R. 1985. What diving animals might tell us about blood flow regulation. *Perspectives in Biol. Med.* 28, 465-474.
- Griffith O W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
- Habig W H, Jakoby W B. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218-235.
- Haddad J J. 2002a. Science review: redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor- κ B. *Crit. Care* 6, 481-490.
- Haddad J J. 2002b. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell. Signal.* 14, 879-897.
- Haddad J J. 2002c. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cell. Signal.* 14, 799-810.
- Haddad J J. 2002d. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cell. Signal.* 14, 799-810.
- Haddad J J, Land S C. 2001. A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α ? *FEBS Lett.* 505, 269-274.
- Haddad J J, Harb H L. 2005. L-gamma-glutamyl-l-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol. Immunol.* 42, 987-1014.
- Halasz N, Elsner R, Garvie R, Grotke G. 1974. Renal recovery from ischemia: a comparative study of harbor seal and dog kidneys. *Am J Physiol* 227, 1331-1335.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Oxford. 936 pp.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300.
- Harman D. 2006. Free Radical Theory of Aging: An Update. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 1067, 10-21.

- Heise K, Puntarulo S, Nikinmaa M, Lucassen M, Portner H O, Abele D. 2006a. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 143A, 494-503.
- Heise K, Puntarulo S, Nikinmaa M, Abele D, Portner H O. 2006b. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. *J. Exp. Biol.* 209, 353-363.
- Heise K, Estevez M S, Puntarulo S, Galleano M, Nikinmaa M, Pörtner H O, Abele D. 2007. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish *J. Comp. Physiol. B.* 177, 765-777.
- Hermes-Lima M, Storey K B. 1993. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* 265, R646-R652.
- Hermes-Lima M, Storey K B. 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am J Physiol* 268, R1386-1393.
- Hermes-Lima M, Storey K B. 1996. Relationship between Anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana Pipiens*. *Am J Physiol* 271, R918-925.
- Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B, 437-448.
- Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B. 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. En: Storey K B, Storey J M (Eds.). *Cell and Molecular Responses to Stress* vol. 2. Elsevier. Amsterdam. pp. 263-287.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 537-556.
- Hochachka P W, Liggins G C, Qvist J, Schneider R, Snider M Y, Wonders T R, Zapol W M. 1977. Pulmonary metabolism during diving: conditioning blood for the brain. *Science* 198, 831-833.
- Hochachka P W. 1981. Brain, lung and heart functions during diving and recovery. *Science.* 212, 509-514.
- Hochachka P W, Castellini J M, Hill R D, Schneider R C, Bengtson J L, Hill S E, Liggins G C, Zapol W M. 1988. Protective metabolic mechanisms during liver ischemia: Transferable lessons from long-diving animals. *Moll. Cell. Biochem.* 87, 77-85.
- Hochachka P W. 2000. Pinniped diving response mechanism and evolution: a window on the paradigm of comparative biochemistry and physiology. *Comp. Biochem. Physiol.* 126A, 435-458.
- Huang L E, Arany Z, Livingston D M, Bunn H F. 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J. Biol. Chem.*, 271, 32253-32259.
- Irving L. 1956. Physiological insulation of swine as bare-skinned mammals. *J. Appl. Physiol.* 9, 414-420
- Irving L, Peyton L J, Monson M. 1956. Metabolism and insulation of bare-skinned swine in Alaska. *J. Appl. Physiol.* 9, 421-426.
- Jaakkola P, Mole D R, Tian Y M, Wilson M I, Gielbert J, Gaskell S J, von Kriegsheim A, Hebestreit H F, Mukherji M, Schofield C J, Maxwell P H, Pugh C W, Ratcli P J. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jakoby W. 1985. Glutathione transferases: an overview. *Methods Enzymol.* 113, 495-499.
- Johnson P, Elsner R, Zenteno-Savín T. 2004. Hypoxia-inducible factor in ringed seal (*Phoca hispida*) tissues. *Free Radic. Res.* 38, 847-854.

- Johnson P, Elsner R, Zenteno-Savín T. 2005. Hypoxia-inducible factor proteomics and diving adaptations in ringed seal. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 205–212.
- Kamencic H, Griebel R W, Lyon A W, Paterson P G, Juurlink B H J. 2001. Promoting glutathione synthesis after spinal cord trauma decreases secondary damage and promotes retention of function. *FASEB J.* 15, 243-250.
- Kanatous S B, DiMichele L V, Cowan D F, Davis R W. 1999. High aerobic capacities in the skeletal muscles of pinnipeds: adaptations to diving hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 86, 1247-1256.
- Kanatous S B, Davis R W, Watson R, Polasek L, Williams T M, Mathieu-Costello O. 2002. Aerobic capacities in the skeletal muscles of Weddell seals: key to longer dive durations? *J. Exp. Biol.* 205, 3601-3608.
- Kenny D E, O'Hara T M, Chen T C, Lu Z, Tian X, Holick M. F. 2004. Vitamin D content in Alaskan Arctic zooplankton, fishes, and marine mammals. *Zoo Biol.* 23, 33-43.
- Kerem D, Elsner R. 1973. Cerebral tolerance to asphyxial hypoxia in the harbor seal. *Resp. Physiol.* 19, 188-200.
- King J E. 1983. *Seals of the World*. British Museum (Natural History), Cornell University Press. Ingalterra. 239 pp.
- Kirlin W G, Cai J, Thompson S A, Diaz D, Kavanagh T J, Jones D P. 1999. Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1208-1218.
- Kooyman G L. 1989. Diving physiology: marine mammals. En Wood S C (Ed.). *Comparative pulmonary physiology: current concepts*. Marcel Dekker. Nueva York. Pp. 721-734.
- Kooyman G L. 2002. Diving Physiology. En: Perrin W F, Würsig B, Thewissen J G M (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. EUA. Pp. 339-344.
- Kooyman G L, Ponganis P J. 1998. The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 19–32.
- Kosower N S, Kosower E M. 1978. The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cyt.* 54, 109–160.
- Kuppusamy P, Zweier J L. 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* 264, 9880-9884.
- Lando D, Pongratz I, Poellinger L, Whitelaw M L. 2000. A Redox Mechanism Controls Differential DNA Binding Activities of Hypoxia-inducible Factor (HIF) 1 α and the HIF-like Factor
- Lefant C. 1969. Physiological properties of blood of marine mammals. En: Andersen H T (Ed.). *The biology of marine mammals*. Academic Press. Nueva York. Pp 95-116.
- Leopold J A, Loscalzo J. 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 279, H2477-2485.
- Levine R L, Garland D, Oliver C N, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman E R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186, 464-478.
- Levine R L, Williams J A, Stadtman, E R, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346-357.
- Lushchak V I, Lushchak L P, Mota A A, Hermes-Lima M. 2001 Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am J. Physiol.* 280, R100-R107.

- Maxwell P H, Wiesener M S, Chang G W, Clifford S C, Vaux E C, Cockman M E, Wykoff C C, Pugh C W, Maher E R, Ratcliffe P J. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.
- McCord J M. 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.* 312, 354–64.
- McCord J M, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 243, 5753–5760.
- Meister A, Anderson M E. 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Mendez L C, Alvarez-Castañeda S T, Acosta-Vargas B, Sierra-Beltrán A P. 2002. Trace metals in tissues of gray whale carcasses (*Eschrichtius robustus*) from the northern pacific mexican coast. *Bull. Mar. Poll.* 44, 217–221.
- Mohazzab-H K M, Agarwal R, Wolin M S. 1999. Influence of glutathione peroxidase on coronary artery responses to alterations in PO₂ and H₂O₂. *Am. J. Physiol.* 276, H235–H241.
- Muñoz-Barbosa A, Gutierrez-Galindo E A, Segovia-Zavala J A, Delgadillo-Hinojosa F, Sandoval-Salazar G. 2004. Trace metal enrichment in surficial sediments of the northwest coast of Baja California, Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 48, 596–603.
- Murphy B J, Hochachka P W. 1981. Free amino acid profiles in blood during diving and recovery in the Antarctic Weddell seal. *Can. J. Zool.* 59, 455–459.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 331–358.
- Persky A M, Green P S, Stublely L, Howell C O, Zaulyanov L, Brzaeau GA, Simpkins J W. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 59–66.
- Pippenger C E, Browne R W, Armstrong D. 1998. Regulatory antioxidant enzymes. En: Armstrong D (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Nueva Jersey. pp. 299–313.
- Prohaska J R. 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta* 611, 87–98.
- Qvist J, Hill R D, Schneider R C, Falke K J, Liggins G C, Guppy M, Elliot R L, Hochachka P W, Zapol W M. 1986. Hemoglobin concentrations and blood gas tensions of free-diving Weddell seals. *J. Appl. Physiol.* 61, 1560–1569.
- Raila J, Buchholz I, Aupperle H, Raila G, Schoon H A, Schweigert F J. 2000. The distribution of vitamin A and retinol-binding protein in the blood, plasma, urine, liver and kidneys of carnivores. *Vet. Res.* 31, 541–551.
- Ramires P R, Ji L L. 2001. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am. J. Physiol.* 281, H679–688.
- Ramírez J M, Folkow L P, Blix A S. 2007. Hypoxia Tolerance in Mammals and Birds: From the Wilderness to the Clinic. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 113–143.
- Ramos-Vasconcelos G R, Hermes-Lima M. 2003 Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* 206, 675–685.
- Ramos-Vasconcelos G R, Cardoso L A, Hermes-Lima M. 2005. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140 C, 165–174.

- Reynolds III J E, Odell D K, Rommel S A. 1999. Marine mammals of the world. En: Reynolds III J E, Rommel S A (Eds.). *Biology of Marine Mammals*. Smithsonian Institution Press. EUA. pp. 1-14.
- Richard D E, Berra E, Pouyssegur J. 2000. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 26765-26771.
- Riedman M. 1990. *The pinnipeds, seals, sea lions and walruses*. University of California Press. Berkley. 439 pp.
- Salceda S, Caro J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.*, 272, 22642-22647.
- Sañudo-Wilhelmy S A, Russell F A. 1998. Trace Metal Concentrations in the Surf Zone and in Coastal Waters off Baja California, Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1575-1580.
- Schafer F Q, Qian S Y, Buettner G R. 2000. Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cell. Mol. Biol.* 46, 657-662.
- Schaefer F Q, Buettner G R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol Med.* 30, 1191-1212.
- Schmidt-Nielsen K. 2001. *Animal physiology. Adaptation and environment*. Cambridge Univeristy Press. E.U.A. 612 pp.
- Schweigert F J, Stobo W T, Zucker H. 1987. Vitamin A status in the grey seal (*Halichoerus grypus*) on Sable Island. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 57, 239-245.
- Schweigert F J, Ryder O A, Rambeck W A, Zucker H. 1990a. The majority of vitamin A is transported as retinyl esters in the blood of most carnivores. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A, 573-578.
- Schweigert F J, Stobo W T, Zucker H. 1990b. Vitamin E and fatty acids in the grey seal (*Halichoerus grypus*). *J. Comp. Physiol.* 159B, 649-654.
- Schweigert F J, Uehlim-Harrell S, von Hegel G, Wiesner H. 1991. Vitamin A (retinol and esters), α -tocopherol and lipid levels of captive and wild mammals and birds. *J. Vet. Med. A.* 38, 35-42.
- Schunemann H J, McCann S, Grant B J, Trevisan M, Muti P, Freudenheim J. L. 2002. Lung function in relation to intake of carotenoids and other antioxidant vitamins in a population-based study. *American Journal of Epidemiology* 155 (5): 463-71.
- Sierra-Beltrán AP, Palafox-Urbe M, Grajales-Montiel J, Cruz-Villacorta A; Ochoa J L. 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35, 447-453.
- Sies H. 1985. *Oxidative stress*. Academic Press. San Diego. 507 pp.
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916-921.
- Silvagni P A, Lowenstine L J, Spraker T, Lipscomb T P, Gulland F M D. 2005. Pathology of domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Pathol.* 42, 184-191.
- Southcott R V, Chesterfield N J, Lugg D J. 1971. Vitamin A content of the livers of huskies and some seals from Anrattic and subantarctic regions. *Med. J. Aus.* 1, 311-313.
- Stegeman J J, Brouwner M, Di Giulio R T, Förlin L, Fowler B A, Sanders B M, Van Veld P A. 1992. Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. En: Hugget R J, Kimarle R A, Mehrle Jr P M, Bergman H L(Eds.). *Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida. Pp.272-315.

- Stewart R E A, Lavigne D M. 1980. Neonatal growth of northwest Atlantic Harp seals, *Pagophilus groenlandicus*. J. Mammal. 61, 670-68.
- Stone T W, Simmonds H A. 1991. Purines: basical and clinical aspects. Springer. Berlin. 364 pp.
- Suzuki K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: Taniguchi N, Gutteridge J (Eds.). Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species. Oxford University Press, Londres. pp. 91-95.
- Thompson-Gorman SL, Zweier JL. 1990. Evaluation of the Role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. J. Biol. Chem. 265, 6656-6663.
- Tian W N, Braunstein L D, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton R. C. 1999. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. Am. J. Physiol. 276, C1121-1131.
- Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal. Biochem. 27, 502-522.
- Tsuchida S. 2000. Glutathione transferase. En: Taniguchi N, Gutteridge J (Eds.). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press. Londres. pp: 83-85.
- Tsuchida S, Sato K. 1992. Glutathione transferases and cancer. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27, 337-384.
- Valdivia P A, Zenteno-Savin T, Gardner S C, Aguirre A A. 2007. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). Comp. Biochem. Physiol. 146C, 301-308.
- Vázquez-Medina J P, Zenteno-Savín T, Elsner R. 2006 Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: Potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. Comp. Biochem. Physiol. 142C, 198-204.
- Watanabe I, Kunito T, Tanabe S, Amano M, Koyama Y, Miyazaki N, Petrov E A, Tatsukawa R. 2002. Accumulation of heavy metals in Caspian seals (*Phoca caspica*). Arch. Environ. Contom. Toxicol 43, 109-120.
- Webster K A. 2007. Hypoxia: Life on the Edge. Antiox. Redox. Sing. 9, 1303-1307.
- Weise M J, Costa D P. 2007. Total body oxygen stores and physiological diving capacity of California sea lions as a function of sex and age. J. Exp. Biol. 210, 278-289.
- Wilhem-Filho D, Sell F, Ghislandi M, Carrasquedo F, Fraga C G, Wallauer J P, Simoes-Lopes P C, Uhart M M, 2002. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. Comp. Biochem. Physiol. 133A, 885-892.
- Willmore W G, Storey K B. 2005. Purification and properties of the glutathione s-transferases from the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta elegans*. FEBS J. 272, 3602-3614.
- Zar J H. 1999. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. Nueva Jersey. 123 pp.
- Zenteno-Savín T, Elsner R. 1998. Seals and oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 25, S42.
- Zenteno-Savín T, Elsner R. 2000. Differential oxidative stress in ringed seal tissues. Free. Radic. Biol. Med 29, S139.
- Zenteno-Savín T. 2002. Oxidative stress in marine organisms: a review. En: Johnson P, Boldryev A A (Eds.). Oxidative stress at molecular, cellular and organ levels. Research Singpost. Kerala, India. Pp. 67-76.

Zenteno-Savín T, Clayton-Hernández E, Elsner R. 2002. Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress? *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 527-536.