



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LOS INDICADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO ASOCIADOS A LAS
CARACTERÍSTICAS DE NADO EN
ELASMOBRANQUIOS Y TELEÓSTEOS

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

MARCELA VÉLEZ ALAVEZ

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 15 del Mes de Junio del 2015, 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:

"Evaluación de los indicadores de estrés oxidativo asociados a las características de nado en elasmobranquios y teleósteos"


Presentada por el alumno:

Marcela Vélez Alavez

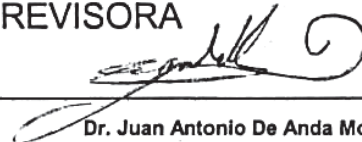
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología Marina

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 Savín
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Juan Antonio De Anda Montañez
CO-TUTOR



Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez
CO-TUTOR



Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz
CO-TUTOR


Dr. Felipe Galván Magaña
CO-TUTOR
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Tania Zenteno Savín, Directora de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B.C.S., México

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez, Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B.C.S., México

Dr. Juan Antonio De Anda Montañez, Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B.C.S., México

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz, Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B.C.S., México

Dr. Felipe Galván Magaña, Co-Tutor

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S., México

COMITÉ EVALUADOR DE TESIS

Dra. Tania Zenteno Savín

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Dr. Juan Antonio De Anda Montañez

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

Dr. Felipe Galván Magaña

JURADO DE EXAMEN

Dra. Tania Zenteno Savín

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Dr. Juan Antonio De Anda Montañez

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

Dr. Felipe Galván Magaña

SUPLENTES

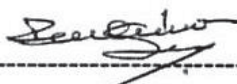
Dr. Eduardo Francisco Balart Páez

Dra. Elena Palacios Mechetnov

RESUMEN

Cuando los organismos hacen ejercicio, la demanda de energía, el flujo de oxígeno y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), incluyendo radicales libres, aumenta. Por esta razón, el músculo ejercitado puede ser considerado como uno de los principales blancos de estrés oxidativo. La respuesta antioxidante está relacionada con el consumo de oxígeno y la producción de ERO, dependiendo de la actividad física de los organismos. Se espera que las especies con elevada actividad física, como el nado constante y altas velocidades de nado, presentarán un incremento en la producción de ERO en el músculo, comparado con las especies de menor actividad física. Además, se ha sugerido que los elasmobranquios difieren evolutivamente de los teleósteos, y que su sistema de defensa antioxidante está compuesto principalmente por antioxidantes no enzimáticos. El objetivo de este estudio fue analizar la producción de ERO, el sistema antioxidante enzimático y no enzimático, y el daño oxidativo en músculo de tres especies de elasmobranquios y tres especies de teleósteos con diferentes características de nado. La producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) fue mayor ($p < 0.05$) en músculo de teleósteos y en las especies más activas. En elasmobranquios, se observó en general, mayor actividad de las enzimas antioxidantes y mayor concentración de las vitaminas C y E ($p < 0.05$); sin embargo, la capacidad antioxidante total fue mayor en teleósteos ($p < 0.05$). El daño oxidativo a lípidos fue mayor en músculo de elasmobranquios ($p < 0.05$) y el daño al ADN fue mayor en músculo de teleósteos ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la producción de ERO y las defensas antioxidantes en el músculo de peces está relacionada con la actividad física, la ingesta de nutrientes y el medio en el que cada especie se desarrolla.

Palabras clave. Actividad física, estrés oxidativo, peces.



Dra. Tania Zenteno Savín

Directora de tesis

ABSTRACT

When organisms exercise, the energy demand, oxygen flow and production of reactive oxygen species (ROS), including free radicals, increase. Therefore, working muscles can be considered as one of the main targets of oxidative stress. The antioxidant response is related to oxygen consumption and ROS production, depending on physical activity. It is anticipated that species with elevated physical activity, such as constant swimming and the capacity to develop high swimming velocities, have increased ROS production in muscle compared to less active species. Additionally, it has been suggested that elasmobranchs differ evolutionarily from teleosts in that their antioxidant defense system is mainly composed of non-enzymatic antioxidants. The aim of this study was to analyze the production of ROS, the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system, and oxidative damage in muscle of three elasmobranch and three teleost species with different swimming characteristics. The production of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) was higher ($p < 0.05$) in muscle of teleosts and in the more active species. In elasmobranchs, higher activity of antioxidant enzymes and higher concentrations of vitamins C and E ($p < 0.05$) were generally observed; however, the total antioxidant capacity was greater in teleosts ($p < 0.05$). Oxidative damage to lipids was higher in muscle of elasmobranchs ($p < 0.05$) and DNA damage was higher in muscle of teleosts ($p < 0.05$). These results suggest that ROS production and antioxidant defenses in fish muscle are related to physical activity, nutrient intake, and the environment in which each species develops.

Keywords: Physical activity, oxidative stress, fishes.

DEDICATORIA

A mi familia, Tika y Miztli por estar cada día conmigo...

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca otorgada (212233/65878) y al CIBNOR por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al departamento de posgrado, por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. Tania Zenteno Savín, por su guía, ayuda, consejos y enseñanza.

Al Dr. Antonio de Anda, por su apoyo, orientación y consejos, por su amistad, muchas gracias.

A los doctores Lía Méndez, Humberto Mejía y Felipe Galván, por su asesoría, consejos y el ánimo brindado.

Al IBQ Orlando Lugo Lugo y a los biólogos Norma Olguín Monroy y Hever Latisnere Barragán por el apoyo técnico otorgado durante el desarrollo de este trabajo.

Al M. en C. Moises Valderrama (UNAM), por su orientación, ayuda y tiempo dedicado.

Al Dr. Felipe Galván y la Dra. Sofía Ortega del CICIMAR por su colaboración con la colecta de muestras analizadas en mi tesis.

Al grupo de trabajo "Totoaba" (Doc. Toño, Horacio, Jony, Lucy, Norma, Laura, Fausto, Oswaldo) por la ayuda en la colecta de muestras, su amistad y ánimo.

A mis queridos amigos del laboratorio de "Estrés Oxidativo", Normita, Orlando, Robertito, Bere, Aldo, Iris, Adri, Olinda, Priscila, Omar, Ramón, Adolfo, por tantos buenos momentos, por sus aportes a mi trabajo, por fomentar un bonito ambiente de trabajo, sobre todo por su amistad, muchas gracias.

A mis amigos del touchito, Ariel, Manuel, Amaury, Hever, David, Faustini, Oswaldito, Calin, por hacerme pasar muy buenos momentos y sonreír conmigo, por su valiosa amistad, muchas gracias.

A Fausto y Cris, Charlotte y Pedro, Roberto y Lily, por su apoyo constante, confianza, cuidado, amistad, muchas gracias.

A mis queridas Aurora, Mariana, Normita, Charlotte, Tanicha, ya se la saben.

A Laura Rivera, Arletina, Reneé, Naty, Rosy, Fer amigo, Rafa, Raúl, Enrique (yoga), por los muy buenos momentos compartidos, apoyo y amistad.

A todos, por ser mi segunda familia, gracias totales.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	v
LISTADO DE FIGURAS	vii
LISTADO DE TABLAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	11
5. HIPÓTESIS	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6.1 Área de estudio	12
6.2 Especies de estudio.....	15
6.2.1 Elasmobranquios	15
6.2.2 Teleósteos	17
6.3 Colecta de muestras.....	18
6.4 Análisis de muestras.....	19
6.4.1 Producción de ERO, determinación de Radical Superóxido ...	19
6.4.2 Antioxidantes enzimáticos.....	20
6.4.2.1 Superóxido Dismutasa.....	20
6.4.2.2 Catalasa	21
6.4.2.3 Glutación Peroxidasa	21
6.4.2.4 Glutación Reductasa	22
6.4.2.5 Glutación-S-Transferasa	22
6.4.2.6 Determinación de proteínas totales	23
6.4.3 Antioxidantes no enzimáticos.....	23
6.4.3.1 Vitamina C	23
6.4.3.2 Vitamina E	24
6.4.4 Capacidad antioxidante total	25
6.4.5 Daño oxidativo	26
6.4.5.1 Peroxidación de lípidos.....	26
6.4.5.2 Carbonilos protéicos	27
6.4.5.3 Daño al ADN.....	28
6.5 Análisis estadísticos	29
7. RESULTADOS	29
7.1 Producción de ERO, determinación de Radical Superóxido.....	30

7.2 Sistema antioxidante enzimático	31
7.2.1 Actividad de Superóxido Dismutasa.....	31
7.2.2 Actividad de Catalasa	32
7.2.3 Actividad de Glutación Peroxidasa	33
7.2.4 Actividad de Glutación Reductasa	34
7.2.5 Actividad de Glutación-S-transferasa.....	35
7.3 Sistema antioxidante no enzimático	36
7.3.1 Vitamina C.....	36
7.3.2 Vitamina E.....	37
7.4 Capacidad antioxidante total	38
7.5 Daño oxidativo	39
7.5.1 Peroxidación de lípidos	39
7.5.2 Carbonilos protéicos	40
7.5.3 Daño al ADN	41
7.6 Análisis discriminantes	43
7.6.1 Análisis entre grupos, elasmobranquios y teleósteos	43
7.6.2 Análisis en elasmobranquios.....	46
7.6.3 Análisis en teleósteos	49
7.6.4 Análisis por actividad de nado.....	52
8. DISCUSIÓN	55
8.1 Producción de Radical Superóxido.....	55
8.2 Sistema antioxidante enzimático	58
8.3 Sistema antioxidante no enzimático	62
8.4 Capacidad antioxidante total	66
8.5 Daño oxidativo	67
8.6 Análisis entre grupos, especies y por actividad de nado	75
9. CONCLUSIONES	77
10. LITERATURA CITADA.....	79
11. ANEXOS	96

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Áreas de muestreo en el Pacífico Oriental y Golfo de California. (A) San Lázaro, (B) Punta Lobos, (C) Cabo San Lucas, (D) Ensenada de Muertos, (E) El Sargento, (F) Bahía de San Luis Gonzaga (Alto Golfo de California). Tomado de [www. nasa. gov](http://www.nasa.gov) 13
- Figura 2.** Tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*). Tomado de Compagno, 2002 15
- Figura 3.** Tiburón azul (*Prionace glauca*). Tomado de Compagno, 2002 16
- Figura 4.** Tiburón mamón (*Mustelus henlei*). Tomado de Compagno, 2002 16
- Figura 5.** Marlín rayado (*Kajikia audax*). Tomado de Fischer *et al.*, 1995 17
- Figura 6.** Dorado (*Coryphaena hippurus*). Tomado de Fischer *et al.*, 1995 18
- Figura 7.** Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Tomado de Fischer *et al.*, 1995 18
- Figura 8.** Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como medianas, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 31
- Figura 9.** Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 32
- Figura 10.** Actividad de la enzima catalasa (CAT, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 33
- Figura 11.** Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre

grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 34

Figura 12. Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 35

Figura 13. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 36

Figura 14. Concentración de vitamina C ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 37

Figura 15. Concentración de vitamina E ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 38

Figura 16. Capacidad antioxidante total (% reducción) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 39

- Figura 17.** Peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 40
- Figura 18.** Carbonilos protéicos ($\mu\text{m g}^{-1}$ tejido) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 41
- Figura 19.** Concentración de 8-OHdG (8-OHdG, ng mL⁻¹) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$ 42
- Figura 20.** Diagrama de puntajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) en 6 especies de peces, elasmobranquios (delimitados con línea roja) y teleósteos (delimitados con línea amarilla) 45
- Figura 21.** Diagrama de puntajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) en 3 especies de peces elasmobranquios 48
- Figura 22.** Diagrama de puntajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) en 3 especies de teleósteos 51
- Figura 23.** Diagrama de puntajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) entre pares de especies con actividad física similar 54

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de las fibras musculares en peces con base en el color y sus características fisiológicas. Las descripciones están basadas en el elasmobranquio (<i>Scyliorhinus canicula</i>) y en el teleósteo (<i>Cyprinus carpio</i>) (Johnston <i>et al.</i> , 1974, 1977; Bone y Chubb, 1978)	4
Tabla II. Características generales de las diferentes especies de estudio (Cailliet y Goldman, 2004; Cisneros-Mata <i>et al.</i> , 1995; Fischer <i>et al.</i> , 1995; Froese y Pauly, 2009).....	19
Tabla III. Especies de estudio para cada grupo de peces, número de organismos colectados (N), proporción de sexos por especie, talla (LT, longitud total (cm); Lm-f, longitud maxilar-furcal (cm); nd, no determinado), lugar de colecta	30
Tabla IV. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas, para seis especies de peces, elasmobranquios y teleósteos	44
Tabla V. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas, para seis especies de peces, elasmobranquios y teleósteos. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco.....	44
Tabla VI. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas para tres especies de peces, elasmobranquios	47
Tabla VII. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas para tres especies de peces, elasmobranquios. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco.....	47
Tabla VIII. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas para tres especies de peces, teleósteos	50
Tabla IX. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas para tres especies de peces teleósteos. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco	50
Tabla X. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas para pares de especies con actividad física similar	53
Tabla XI. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas para pares de especies con actividad física similar. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco.....	53

1. INTRODUCCIÓN

Los peces constituyen más de la mitad del número total de especies de vertebrados reconocidas (48,170) (Nelson, 1994). Estos organismos muestran una diversidad en su morfología, en los hábitats que ocupan y en su biología (Nelson, 1994). Dentro del grupo de peces, se encuentran los cartilagosos y los peces óseos. La principal diferencia entre ellos es que los peces cartilagosos, como los tiburones, carecen de los componentes bioquímicos necesarios para la formación de huesos, no poseen vejiga natatoria, tienen altas concentraciones de urea en sus tejidos y son menos diversos biológicamente (Wilhelm-Filho y Boveris, 1993; Nelson, 1994). Una característica de los tiburones es que requieren estar en nado constante para la captación adecuada de oxígeno y mantener el equilibrio hidrostático (Carlson *et al.*, 1999).

El metabolismo de los elasmobranquios difiere del de otras especies de peces (Ballantyne, 1997). Los elasmobranquios son osmoconformadores, es decir, son capaces de retener altas concentraciones de solutos para prevenir cambios en el equilibrio osmótico con el medio marino (Richards *et al.*, 2003). Además, emplean la urea como osmolito orgánico para reducir su densidad (Hart y Reynolds, 2002). La retención de altas concentraciones de urea puede influir sobre la estructura y propiedades de proteínas y membranas, causando impacto sobre los mecanismos básicos del metabolismo de lípidos, cuerpos cetónicos y aminoácidos (Richards *et al.*, 2003).

Los peces utilizan varias estrategias para sobrevivir a los cambios ambientales, incluyendo cambios en su comportamiento, su fisiología y características moleculares (Kieffer, 2010). Los mecanismos de adaptación de estos organismos están determinados por los antecedentes evolutivos de cada especie y de las características físicas y químicas del agua (Hart y Reynolds, 2002). Estas características del agua, particularmente la baja compresibilidad, alta densidad, su propiedad de solvente y transparencia limitan el diseño funcional de un pez (Hart y Reynolds, 2002).

La baja compresibilidad del agua influye en el rendimiento de natación del pez, que tiene que desplazar grandes volúmenes de agua para moverse a través de ella (Hart y Reynolds, 2002). Por este motivo, los peces han desarrollado diferentes sistemas motrices para reducir la fuerza de arrastre y los costos de locomoción e incrementar la eficiencia de las adaptaciones respiratorias y cardiovasculares durante el nado (Hart y Reynolds, 2002). La alta densidad del agua reduce los efectos de la gravedad y permite a los peces permanecer suspendidos en la columna de agua usando una mínima cantidad de energía.

Existen dos estrategias de flotabilidad, dinámica y estática; los peces pueden emplear una o ambas estrategias (Hart y Reynolds, 2002). La flotabilidad dinámica es usada por elasmobranquios y algunos teleósteos activos, los cuales tienen cuerpos más pesados que el agua. La flotabilidad es generada por las aletas pectorales y caudal, actuando como hojas de levantamiento alrededor del centro de gravedad del pez; se requiere una velocidad mínima de desplazamiento para evitar el hundimiento del animal (Hart y Reynolds, 2002).

Un esfuerzo continuo para soportar al cuerpo sólo por movimientos musculares sería energéticamente costoso (Marshall, 1966). Por lo tanto, la mayoría de los teleósteos, excepto las especies bentónicas que nadan ocasionalmente, usan el levantamiento estático para la flotabilidad (Hart y Reynolds, 2002). Los peces consiguen la flotabilidad estática mediante el uso de dos diferentes compuestos, lípidos y gas. Los gases son más eficientes que los lípidos para proveer levantamiento; así, los peces que poseen vejiga natatoria pueden soportar los componentes pesados de su cuerpo (Hart y Reynolds, 2002).

El nivel de rendimiento de natación en los peces es definido tradicionalmente en términos de la duración e intensidad del ejercicio (Beamish, 1978). El nado se clasifica en tres categorías, sostenido, prolongado y de estallido. De manera general, los peces pueden desarrollar los tres tipos de nado dependiendo de la situación en la que se encuentren; por ejemplo, migraciones y procesos de alimentación o escape (Brett, 1964; Beamish, 1978; Hammer, 1995; Plaut, 2001).

El metabolismo aeróbico puede sustentar el ejercicio sostenido con bajas velocidades de nado mantenidas por largos periodos de tiempo (típicamente mayores de 200 minutos) sin resultar en fatiga muscular (Beamish, 1978). El ejercicio prolongado entre 2 y 200 minutos, dependiendo de la velocidad de nado, puede terminar en agotamiento. La actividad intensa de estallido depende casi exclusivamente del metabolismo anaeróbico y dura cortos periodos de tiempo, típicamente menos de 20 s; este tipo de ejercicio comúnmente resulta en una reducción significativa del suministro de energía intracelular y en una acumulación de productos de desecho (Kieffer, 2000).

Para los vertebrados en general, el músculo esquelético representa una porción significativa de la masa corporal del organismo. Como fenotipo, el músculo mantiene su plasticidad a través de la vida de un organismo y puede ser remodelado en respuesta a señales de desarrollo, energéticas y medioambientales (Le Moine *et al.*, 2010).

A diferencia de las fibras musculares de mamíferos que son altamente heterogéneas, el músculo esquelético en peces está compuesto por dos tipos de fibras musculares separadas anatómicamente, roja (tipo I u oxidativa) y blanca (tipo II u glucolítica) (Le Moine *et al.*, 2010). La mayoría de estas fibras musculares en peces están formadas por músculo blanco. De manera general, el músculo rojo en peces se ubica en una zona superficial de fibras situadas bajo la línea lateral y sobre la superficie del tronco del pez (Johnston, 1980; Altringham y Ellerby, 1990).

Los tipos de fibras musculares difieren en su velocidad de contracción, metabolismo energético y reclutamiento a diferentes velocidades de nado. Las fibras musculares rojas son las de contracción más lenta, su principal fuente de energía son los lípidos por lo que poseen enzimas involucradas en la lipólisis durante el metabolismo aeróbico. Las fibras musculares rojas son usadas en el nado de resistencia y en el nado sostenido de baja velocidad. Por otro lado, en las fibras musculares blancas la velocidad de contracción es alta y la energía es, en su mayoría, derivada de glucólisis anaeróbica. El músculo blanco está activo en altas velocidades de nado o en ciertos eventos, como el de escape (Johnston,

1980; Altringham y Ellerby, 1990; Gibb y Dickson, 2002). En la tabla I se pueden observar las características fisiológicas principales de los tipos de musculatura en peces.

Tabla I. Clasificación de las fibras musculares en peces con base en el color y sus características fisiológicas. Las descripciones están basadas en el elasmobranquio (*Scyliorhinus canicula*) y en el teleósteo (*Cyprinus carpio*).

CLASIFICCIÓN POR COLOR	CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS
<i>Elasmobranquio</i>^a	
Músculo rojo externo	De lenta contracción, altamente aeróbico. Las fibras rojas externas se distinguen histoquímicamente por su mayor actividad de succinil deshidrogenasa y menor actividad de ATPasa miofibrilar.
Músculo rojo interno	
Musculo blanco externo	Contracción rápida, capacidad aeróbica intermedia y capacidad glucolítica altamente desarrollada.
Musculo blanco interno	Contracción rápida glucolítica, baja capacidad aeróbica.
<i>Teleósteo</i>^b	
Rojo	Lento, altamente aeróbico.
Rosa	Contracción rápida, altas capacidades aeróbica y glucolítica.
Blanco	Contracción rápida glucolítica, baja e intermedia capacidad aeróbica. Con múltiple inervación.

^aDatos de Bone y Chubb, 1978

^bDatos de Johnston *et al.*, 1974, 1977

Dependiendo de las características de natación, los peces se han clasificado como velocistas, nadadores furtivos, nadadores de fondo y de baja actividad, que permanecen en un lugar. Los velocistas se caracterizan por una carencia casi total de fibras rojas (Boddeke *et al.*, 1959). El músculo rojo está activo a todas las velocidades de nado en los teleósteos y el músculo blanco participa a velocidades intermedias de natación y puede ser activado a altos rangos de velocidad de crucero (Hudson, 1973).

Los requerimientos de energía para aumentar la potencia de nado dependen del tamaño del cuerpo y la velocidad (Webb, 1975). Es decir, velocidades de explosión requieren proporcionalmente, más esfuerzo que el nado estable. En los grupos de peces más antiguos (como los elasmobranquios) los diferentes requerimientos energéticos del nado estable y explosivo dan lugar a una división

anat6mica completa y funcional entre los sistemas motores r1pidos y lentos (Bone, 1964; 1970). As1, en el caz6n (*Scyliorhinus canicula*) el nado sostenido es desarrollado totalmente por una delgada l1mina muscular de fibras rojas activas; en contraste, el volumen de musculatura, compuesto por fibras blancas activas, est1 reservado para el nado explosivo (Bone, 1966). En el caz6n, el m1sculo rojo y blanco tienen un patr6n de inervaci6n focal (estimulaci6n de una neurona a una sola c1lula) e inervaci6n m1ltiple o multifocal (estimulaci6n de una neurona a 2 o m1s fibras musculares), y propiedades electrofisiol6gicas similares a otros vertebrados (Bone, 1964; Stanfield, 1972).

Rara vez se ha pensado en el m1sculo esquel6tico como uno de los primeros blancos de estr1s oxidativo, el cual es una alteraci6n en el equilibrio entre la producci6n de prooxidantes y las defensas antioxidantes (Sies, 1991). Sin embargo, el m1sculo parece ser el 1nico tejido capaz de soportar muchos tipos de presi6n o influencias del entorno (Clanton *et al.*, 1999). Una de las condiciones en las que podr1a esperarse un incremento del da1o oxidativo, dada la gran demanda energ6tica y consumo de ox1geno, es el ejercicio (Konigsberg, 2008).

Durante el ejercicio intenso, el m1sculo est1 expuesto a diferentes niveles de cambios mec1nicos y metab6licos que podr1an da1ar o matar a otras c1lulas. Por ejemplo, ning1n otro tejido del cuerpo se somete a un cambio dr1stico en la concentraci6n de ox1geno (O_2) en el metabolismo durante una actividad normal. El flujo de O_2 a trav1s de la mitocondria puede incrementar 100 veces cuando se cambia del estado de reposo hasta el ejercicio m1ximo en fibras musculares oxidativas altamente entrenadas (Clanton *et al.*, 1999).

Si se asume que un porcentaje fijo de este O_2 es reducido en las membranas de la mitocondria y del ret1culo endopl1smico, entonces los m1sculos ejercitados pueden ser potentes generadores de especies reactivas de ox1geno (ERO) (Clanton *et al.*, 1999), como el an1on superoxido ($O_2^{\cdot-}$) y per6xido de hidr6geno (H_2O_2), como productos del metabolismo oxidativo (Wilhelm-Filho *et al.*, 1993).

Dada la susceptibilidad de los peces al ataque por ERO, tal como sucede con el resto de los organismos aer6bicos, 1stos han desarrollado defensas

antioxidantes; especialmente enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y enzimas dependientes de glutatión (GSH); como glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Konigsberg, 2008).

Junto con estas enzimas, existen también antioxidantes de bajo peso molecular, como los carotenoides, vitaminas C y E, aminoácidos y péptidos como el GSH (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). Estas defensas antioxidantes, en acción combinada, mantienen bajos los niveles intracelulares de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , conservando así una tasa relativamente baja de generación del radical hidroxilo (HO^{\cdot}), el producto químico de la reacción entre $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . El HO^{\cdot} es capaz de comenzar el proceso de peroxidación de lípidos que es potencialmente peligroso para los tejidos de los peces ya que tienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Wilhelm-Filho *et al.*, 1993).

Distintas circunstancias promueven las defensas antioxidantes en peces. Factores intrínsecos propios del pez, como la edad, posición filogenética y comportamiento alimenticio, además de factores medio ambientales, como el tipo de dieta suministrado, cambios de temperatura diarios o estacionales, O_2 disuelto, toxinas presentes en el agua, patologías o parásitos pueden fortalecer o debilitar las defensas antioxidantes (Trenzado *et al.*, 2006).

De manera general, las enzimas antioxidantes pueden estar correlacionadas con la posición filogenética, observando que la biota ancestral presenta menor actividad de dichas enzimas (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). De acuerdo con Rudneva (1997), hay una escasa actividad de CAT y una baja actividad de SOD en eritrocitos de *Squalus acanthias*, un elasmobranquio primitivo del Mar Negro, sugiriendo que este pez tiene un sistema antioxidante simple. Los altos niveles de urea, glutatión y vitamina K encontrados en este elasmobranquio pueden compensar el limitado sistema antioxidante enzimático (Rudneva, 1997). Otros estudios comparativos han demostrado que las actividades de CAT, SOD y GPx en peces son menores que en mamíferos y aves (Izokun-Etiobhio *et al.*, 1990; Pérez-Campo *et al.*, 1993; Rocha-e-Silva *et al.*, 2004). Parece que, a través del proceso evolutivo, los antioxidantes de bajo peso molecular (no enzimáticos)

aparecieron más temprano que los antioxidantes enzimáticos, jugando un papel crucial contra el estrés oxidativo en las formas de vida más primitivas. Esta teoría se relaciona con el hecho de que altos niveles de antioxidantes no enzimáticos han sido detectados en invertebrados marinos y peces (Mezes, 1986; Kossmann, 1988).

2. ANTECEDENTES

La actividad de enzimas antioxidantes en sangre, hígado, corazón y músculo rojo parece estar correlacionada con la actividad natatoria y metabólica de los peces (Wilhelm-Filho *et al.*, 1993). Comparando estas observaciones con elasmobranquios (rayas y tiburones), se ha encontrado que el hígado muestra la mayor actividad de SOD y CAT en varias especies examinadas (Wilhelm-Filho y Boveris, 1993), siendo los tiburones los que exhiben mayor actividad de enzimas que las rayas. El contenido o actividad de enzimas antioxidantes en elasmobranquios es menor que en teleósteos y parece seguir el consumo metabólico total de oxígeno o el nivel de actividad de cada pez de acuerdo a su grupo taxonómico (Wilhelm-Filho y Boveris, 1993).

La peroxidación de lípidos en hígado muestra valores muy altos, de aproximadamente un orden de magnitud mayor, cuando se compara con mamíferos (Wilhelm-Filho y Boveris, 1993). Recientemente, Rudneva *et al.* (2014) mencionan la importancia de realizar estudios sobre la fisiología de elasmobranquios para entender diferentes procesos evolutivos y mecanismos de adaptación en estos organismos; realizó un análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, peroxidasa (PER) y GR en especies como *Squalus acanthias*, *Raja clavata* y *Dasyatis pastinaca* encontrando que hay diferencias interespecíficas en las actividades enzimáticas relacionadas con la biología y ecología de la especie, observando mayor actividad de las enzimas en hígado de las rayas (bentónicas) en comparación con el tiburón (bentónico/pelágico); lo que

fue relacionado con la exposición a contaminantes (elementos traza) y a condiciones de hipoxia de los hábitats bentónicos en el Mar Negro.

Por otra parte, el músculo esquelético puede generar ERO durante su contracción intensa; la cuestión es cuándo este fenómeno representa una respuesta fisiológica y cuándo puede llegar a ser una patología. El tratamiento con antioxidantes exógenos sugiere que el estado redox basal durante el ejercicio es influenciado por la continua función contráctil, tanto en reposo como durante ejercicio intenso (Clanton *et al.*, 1999).

Algunas condiciones asociadas con el ejercicio intenso, como hipoxia local o elevadas temperaturas en el músculo pueden contribuir también a la producción de ERO. La evidencia de que el músculo adaptado al ejercicio resulta en un aumento de las defensas antioxidantes, también sugiere una relación entre las ERO y la contracción muscular (Clanton *et al.*, 1999). Ciertas condiciones, como un inadecuado aporte de antioxidantes nutrimentales, el desarrollo de actividad física extenuante y/o desordenes genéticos, pueden llevar a un desbalance entre las defensas antioxidantes y la producción de oxidantes, lo que podría llevar a una condición de estrés oxidativo (Kuang, 1991).

En una mezcla de músculo rojo y blanco de adultos de pez cebra (*Danio rerio*) que han estado en entrenamiento de natación durante cuatro semanas incrementa la expresión de enzimas mitocondriales, como la citrato sintasa (CS) (LeMoine *et al.*, 2010). Cuando el ensayo se hace para los tejidos musculares por separado, la actividad de CS aumenta al doble en el músculo blanco, a partir de la primera semana de entrenamiento permaneciendo elevada hasta las 8 semanas de entrenamiento, lo que sugiere un incremento en la capacidad oxidativa en este tipo de fibra (LeMoine *et al.*, 2010). En contraste, la expresión del inductor de biogénesis mitocondrial (generación de nuevas mitocondrias) se incrementa en los dos tipos de músculo sólo después de una semana de entrenamiento (LeMoine *et al.*, 2010). En ambos músculos un golpe de ejercicio induce rápidamente la expresión del gen de biogénesis mitocondrial y su decaimiento (24 h) e incrementa la expresión de CS después del ejercicio. Estos resultados sugieren una compleja

respuesta molecular adaptativa temporal y espacial al ejercicio en músculo esquelético del pez cebra (LeMoine *et al.*, 2010).

El músculo esquelético es el segundo tejido más plástico del cuerpo; tanto la actividad como la inactividad física contribuyen a modificar el músculo esquelético por medio de la señalización a través de impulsos nerviosos y estímulos mecánicos y humorales (Marini y Veicsteinas, 2010). A su vez, el músculo esquelético envía señales al resto del cuerpo, contribuyendo así con el mantenimiento de la homeostasis (Marini y Veicsteinas, 2010).

En tiburones se tenía la hipótesis de que las especies que realizan ejercicio vigoroso, como el tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*) y el tiburón sedoso (*Carcharhinus falciformis*), tienen una mayor producción de ERO y, en consecuencia, mayor actividad de enzimas antioxidantes en músculo, en comparación con especies de menor actividad de nado, como el tiburón martillo (*Sphyrna zygaena*) (López-Cruz *et al.*, 2010). Existe una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ y mayor actividad de glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-S-transferasa (GST) en las especies más activas (López-Cruz *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que la actividad de las enzimas antioxidantes basta para equilibrar la producción de ERO y mantener más bajos los niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) en tiburón mako, contribuyendo a su capacidad de mantener una elevada actividad muscular (López-Cruz *et al.*, 2010).

El nado es un aspecto muy importante para la mayoría de los teleósteos en su historia de vida. Los peces teleósteos muestran una gran variedad de estrategias locomotoras que se pueden ver reflejadas en sus habilidades para la reproducción o en fenómenos como la migración. En general, el nado está relacionado con diferentes procesos biológicos en el organismo, como son desarrollo temprano, crecimiento somático, crecimiento gonadal y maduración (Palstra y Planas, 2011). El ejercicio sostenido puede resultar en mayores tasas de crecimiento, mayor masa muscular esquelética e incremento de la supervivencia. El ejercicio podría representar una forma natural, no invasiva y

económica de mejorar el crecimiento, la calidad de la carne y el bienestar de los peces que son cultivados para consumo (Palstra y Planas, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha sugerido que existen diferencias entre elasmobranchios (peces cartilagosos) y teleósteos (peces óseos) en la respuesta fisiológica que presentan ante diferentes factores relacionados directamente con su modo de vida, como es la actividad física o ejercicio. Se ha sugerido también que esta respuesta depende principalmente de las adaptaciones evolutivas de cada grupo de peces respecto a su posición filogenética, el origen de sus sistemas antioxidantes, de la alimentación y el hábitat en que se desarrollan las diferentes especies de peces (Wilhelm-Filho *et al.*, 1993; Wilhelm-Filho y Boveris, 1993; Rudneva, 1997; López-Cruz *et al.*, 2010).

Los peces nadan para satisfacer sus necesidades básicas de migración, alimentación, escape y reproducción entre otras, por lo que la actividad física es indispensable en su desarrollo y durante todo su ciclo de vida (Palstra y Planas, 2011). Los ajustes que presentan en la intensidad de su actividad física están de acuerdo con las características físicas, metabólicas y fisiológicas propias de cada especie. Por lo tanto, los peces, particularmente aquellos con flotabilidad dinámica, pueden ser considerados como atletas natos dado el hecho de que el éxito en su supervivencia depende directamente de la capacidad de movilidad que tengan (Kieffer, 2010). Además, el ejercicio puede producir cambios fisiológicos importantes en los peces, dependiendo de la intensidad de su actividad física y de las defensas antioxidantes que posean estos organismos, ocasionando un incremento en la formación de radicales libres. Ello puede originar un desequilibrio entre las defensas antioxidantes y la producción de moléculas prooxidantes, lo que puede llegar a originar daño oxidativo en músculo y otros tejidos (Clanton *et al.*, 1999).

Las especies de estudio de este trabajo, tiburones mako, azul y mamón, así como el marlín rayado, dorado y la totoaba como representantes de los peces óseos, abarcan diferentes niveles en la cadena trófica. Además, todas ellas son especies de importancia comercial para el hombre debido a su aprovechamiento en diferentes ámbitos económicos, en algunos casos protegidas por su vulnerabilidad a la sobrepesca. Sin embargo, la información que se tiene acerca de la fisiología de estas especies es poca o nula. Por todo lo anterior, es importante el conocimiento y descripción de diferentes indicadores de estrés oxidativo, incluyendo la producción de moléculas prooxidantes, el sistema de defensa antioxidante y el daño oxidativo, en ambos grupos de peces usando como referencia especies con diferente capacidad de nado, la cual está estrechamente relacionada con su forma de vida.

4. OBJETIVOS

4.1 *Objetivo general*

Determinar posibles diferencias en la producción de ERO ($O_2^{\cdot-}$), el sistema antioxidante enzimático (SOD, CAT, GPx, GR y GST) y no enzimático (vitaminas C y E) y el daño oxidativo (peroxidación de lípidos, carbonilos proteicos y daño a ADN), entre elasmobranquios y teleósteos, considerando las diferencias en su actividad física de acuerdo a sus características de nado.

4.2 *Objetivos particulares*

-Determinar si existen diferencias en los indicadores de estrés oxidativo (producción de ERO, sistema antioxidante enzimático y no enzimático, daño oxidativo) a nivel de grupo, elasmobranquios vs. teleósteos.

-Determinar si existen diferencias en los indicadores de estrés oxidativo (producción de ERO, sistema antioxidante enzimático y no enzimático, daño

oxidativo) entre especies de cada grupo, elasmobranquios y teleósteos con diferentes características de nado.

-Determinar si existen diferencias en los indicadores de estrés oxidativo (producción de ERO, sistema antioxidante enzimático y no enzimático, daño oxidativo) entre pares de especies de los diferentes grupos, elasmobranquio y teleósteo con características similares de nado.

5. HIPÓTESIS

-Considerando que las defensas antioxidantes enzimáticas parecen tener una menor contribución a la capacidad antioxidante en los peces ancestrales, se espera encontrar mayores niveles de antioxidantes no enzimáticos en elasmobranquios y mayor actividad de enzimas antioxidantes en teleósteos.

-Con base en la actividad física de las diferentes especies de peces en cada uno de los grupos, se espera encontrar mayor producción de ERO y mayor capacidad antioxidante en aquellas más activas.

-Debido a la adaptación de los sistemas antioxidantes en especies con diferente actividad física no se espera encontrar diferencias en los indicadores de daño oxidativo entre especies.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 *Área de estudio*

Se colectaron muestras de diferentes localidades de la costa occidental de Baja California Sur; Isla Magdalena, San Lázaro, Punta Lobos y Cabo San Lucas. En el Golfo de California en Ensenada de Muertos, El Sargento y el Alto Golfo en la bahía de San Luis Gonzaga (Fig. 1).



Figura 1. Áreas de muestreo en el Pacífico Oriental y Golfo de California. (A) San Lázaro, (B) Punta Lobos, (C) Cabo San Lucas, (D) Ensenada de Muertos, (E) El Sargento, (F) bahía de San Luis Gonzaga (Alto Golfo de California). Tomado de www.nasa.gov

El pacífico oriental presenta la corriente de California que se caracteriza por su baja temperatura y salinidad aumentando de temperatura conforme avanza hacia el sur. La intensidad o debilitamiento de la corriente depende de la variación de los vientos, en invierno estos provienen del norte, se debilitan y se invierten de sur a norte y la corriente de California es débil; se registran grandes remolinos en la parte sur en ésta época (Álvarez-Sánchez, 1977; Lluch-Belda *et al.*, 2000).

En primavera y otoño los vientos son del norte y la corriente alcanza su mayor extensión; en verano siguen una dirección noreste y continúan siendo fuertes, con la corriente más intensa y la descarga máxima; en otoño la corriente disminuye y se retrae con mayor número de giros, éste patrón modifica las surgencias (Lluch-Belda *et al.*, 2000).

El régimen mareal es semidiurno; las amplitudes aumentan desde Ensenada hasta Punta Abreojos, y de ahí disminuyen hacia Cabo San Lucas, con algunas excepciones como Guerrero Negro y San Carlos, Bahía Magdalena (Lluch-Belda *et al.*, 2000). El contenido de oxígeno se ve influenciado por las bajas temperaturas que propician concentraciones altas entre 5 y 6 mL L⁻¹ a nivel superficial con disminución de norte a sur (De la Lanza-Espino, 2001). Verticalmente, a partir de los 200 o 300 m se detecta la capa anóxica (0.25 mL L⁻¹) de grosor variable localmente a causa de cambios en la corriente de California y la intromisión estacional de la corriente ecuatorial. En la zona de costa el oxígeno disuelto está influenciado por surgencias (donde ascienden aguas menos oxigenadas), y por lagunas, estuarios, bahías y marismas que incrementan el contenido del gas por una mayor producción primaria, con sus variaciones temporales (De la Lanza-Espino, 2001).

El Golfo de California se caracteriza por tener una marea producida por la cooscilación con la marea del Océano Pacífico (Marinone y Lavín, 1997). El comportamiento de la marea es variable y se pueden definir dos regiones, desde la boca del golfo hasta la línea imaginaria que se forma entre Guaymas y Santa Rosalía, la marea tiene un comportamiento mixto con predominancia del tipo diurno; a partir de ese punto hasta el Alto Golfo de California es únicamente semidiurna (Marinone y Lavín, 1997).

El choque de masas de agua entrantes del Océano Pacífico con las del interior del golfo genera remolinos a diferentes latitudes, provocando separación de corrientes costeras. La circulación en el golfo es anticiclónica en invierno con flujo de entrada por la parte occidental (Península de Baja California) y ciclónica en verano con flujo de entrada por la parte oriental (parte continental) (Pegau *et al.*, 2002). El agua del norte del golfo fluye hacia el sur por la superficie debido a su alta temperatura mezclándose con el agua del Pacífico que es agua fría y de baja salinidad; lo que ocasiona una alta productividad del golfo (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991).

Existen bajas concentraciones de oxígeno a profundidades intermedias en el centro-sur del Golfo de California y del Pacífico adyacente. En la mayor parte del golfo las concentraciones de oxígeno son mayores a 1 mL L^{-1} en los 100 m superficiales, decreciendo por debajo de 0.5 mL L^{-1} después de los 150 m golfo. A profundidades de 500 a 1000 m las concentraciones de oxígeno llegan a ser indetectables (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991).

6.2 Especies de estudio

6.2.1 Elasmobranquios

El tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*) (Fig. 2) considerado como depredador tope, es una especie activa y veloz, alcanza alrededor de los 60 km/h, son organismos endotermos con distribución circumtropical, aunque es más abundantes en aguas de 17°C . En la costa occidental de Baja California Sur alcanza una talla máxima de 290 cm de longitud total (LT) y son los organismos juveniles (90-160 cm) los más abundantes. Habitan en la costa occidental y suroriental (área de crianza) de Baja California donde hay alta productividad por afloramiento de plancton. Su alimentación consiste principalmente de cefalópodos, octópodo, crustáceo y peces; siendo los organismos juveniles los que presentan una alimentación más variada que los adultos. Es una especie oceánica y costera, de fertilización interna, es ovovivípara con una gestación de 15 a 18 meses. Pueden alcanzar los 500 m de profundidad (Kohler *et al.*, 2002; Velasco-Tarelo, 2005).

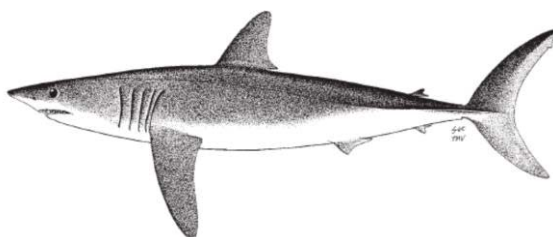


Figura 2. Tiburón mako (*Isurus oxyrinchus*). Tomado de Compagno (2002).

El tiburón azul (*Prionace glauca*) (Fig. 3) es una especie que habita en aguas frías preferentemente (7-16°C); en punta lobos, sitio de muestreo de este estudio se le puede encontrar a una temperatura de 20-22°C, realizan migraciones verticales de día, de entre 300 y 600 m de profundidad; durante la noche están cerca de la superficie, en la termoclina. Es una especie vivípara placentaria, que se alimenta principalmente de cefalópodos, peces, crustáceos, aves, macroalgas y otros tiburones. Son organismos de hábitos oceánicos y epipelágicos, que se pueden encontrar en la franja litoral; sus hábitos migratorios están fuertemente influenciados por la temperatura (migraciones estacionales latitudinales), se ha reportado que pueden alcanzar una edad de 20 a 26 años (Kohler *et al.*, 2002; Hernández-Aguilar, 2008).

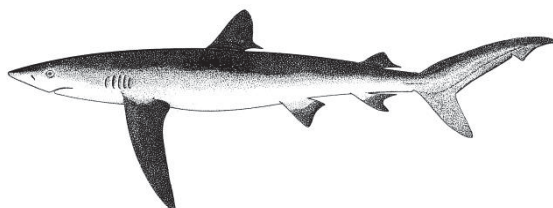


Figura 3. Tiburón azul (*Prionace glauca*). Tomado de Compagno (2002).

El tiburón mamón (*Mustelus henlei*) (Fig. 4) es una especie de aguas templadas y tropicales, preferentemente en los 18°C; se encuentra comúnmente en bahías cerradas y poco profundas de fondos arenosos y fangosos, su talla promedio es de 50 a 70 cm y su longitud máxima es de hasta 95 cm. Es una especie vivípara, placentaria; su alimentación consiste principalmente de crustáceos, moluscos, restos de peces y materia orgánica indefinida (Silva-Santos, 2012; Rodríguez-Romero *et al.*, 2013).

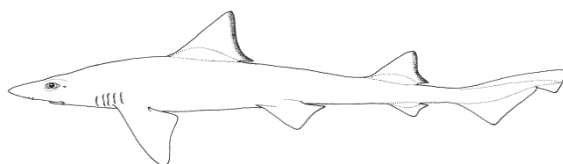


Figura 4. Tiburón mamón (*Mustelus henlei*). Tomado de Compagno (2002).

6.2.2 Teleósteos

El marlín rayado (*Kajikia audax*) (Fig. 5) es un depredador pelágico de aguas templadas y subtropicales; su alimentación consiste principalmente de teleósteos, cefalópodos (más común) y crustáceos. En la zona de los cabos son depredadores oportunistas, con hábitos generalistas. El comportamiento alimenticio del marlín es definido por las condiciones oceanográficas de la boca del Golfo de California; una de las zonas biológicamente más productivas de la costa del Pacífico de México. La utilización de la columna de agua por el marlín es influenciada por la saturación de O₂ y la temperatura de la superficie. La punta de la península de Baja California ofrece una termoclina superficial (22-24 °C) y áreas de montes marinos donde hay grandes cantidades de zooplancton que sustentan la alimentación de los organismos consumidos por los depredadores tope. El área de los cabos es una zona de migración del marlín donde los organismos menores a los 200 cm de longitud postorbital se alimentan principalmente de cardúmenes y almacenan energía para la reproducción (Abitía-Cárdenas *et al.*, 2002; Sevilla-Rodríguez, 2013).

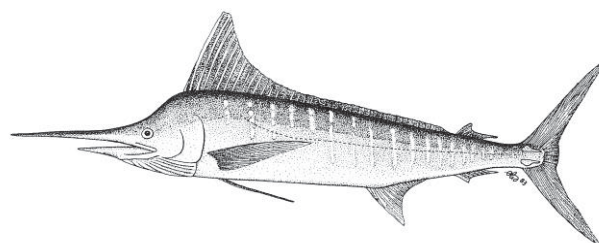


Figura 5. Marlín rayado (*Kajikia audax*). Tomado de Fischer *et al.* (1995).

El dorado (*Coriphaena hippurus*) (Fig. 6) es una especie conocida por su elevada tasa de crecimiento y metabolismo, habita en aguas con temperatura alrededor de los 20°C. Poseen grandes y delgadas áreas de superficie de intercambio de gases en sus branquias permitiendo una gran capacidad de difusión del oxígeno, lo que les permite sustentar sus elevadas tasas metabólicas. Se alimentan principalmente de cefalópodos, crustáceos y peces (Aguilar-Palomino, 1993; Olson y Galván-Magaña, 2002; Tripp-Valdez, 2005).

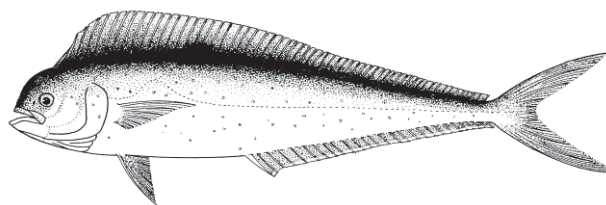


Figura 6. Dorado (*Coriphaena hippurus*). Tomado de Fischer *et al.* (1995).

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Fig. 7) es un consumidor secundario de aguas costeras y fondos rocosos; altamente selectivo se alimenta principalmente de peces de la familia Engraulidae y Atherinidae, también se alimenta de crustáceos. Puede alcanzar tallas de hasta 2 m de longitud y pesar 100 kg. Es una especie longeva, endémica del alto Golfo de California; desova en la boca del Río Colorado en primavera. Los juveniles se alimentan de invertebrados bentónicos y los adultos principalmente de pequeños peces pelágicos (Cisneros-Mata, 1997; Lercari y Chávez, 2007; Rowell *et al.*, 2008).

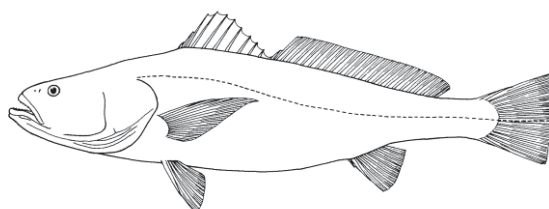


Figura 7. Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Tomado de Fischer *et al.* (1995).

6.3 Colecta de muestras

Se realizaron muestreos al azar en diferentes campamentos pesqueros (San Lázaro, Punta Lobos), en muelles de pesca deportiva (Cabo San Lucas) y sitios de colecta (Ensenada de Muertos, El Sargento, Bahía de San Luis Gonzága) de abril a diciembre de 2011.

Se tomaron muestras de aproximadamente 5 g de músculo de la parte caudal de los organismos de cada especie. Se muestrearon tres especies de peces elasmobranquios (*Isurus oxyrinchus*, *Prionace glauca* y *Mustelus henlei*) y

tres de teleósteos (*Kajikia audax*, *Coryphaena hippurus*, *Totoaba macdonaldi*). Una vez tomada la muestra, se etiquetó y se guardó en frío hasta su almacenamiento en el laboratorio en un ultracongelador a -80°C para su posterior procesamiento y análisis. Los organismos fueron clasificados con base en su estilo de vida (mayor o menor actividad física), considerando las velocidades de nado que pueden alcanzar.

Entre los elasmobranquios, *I. oxyrinchus* es la especie más activa, seguido de *P. glauca* y *M. henlei*; mientras que entre los teleósteos, *K. audax* se considera la especie más activa, seguida de *C. hippurus* y *T. macdonaldi* (Cailliet y Goldman, 2004; Froese y Pauly, 2009). En la Tabla II se pueden observar algunas de las características relevantes de las especies de estudio.

Tabla II. Características generales de las diferentes especies de estudio.

	Madurez Sexual (cm)	Longitud Total Máxima (cm)	Velocidad de nado registrada	Arte de pesca (muestreos)
Elasmobranquios				
<i>I. oxyrinchus</i>	♂ 200-215 ♀ 275-290	>400	74-124 km/h	Palangre
<i>P. glauca</i>	♂ 182-281 ♀ ~220	380	68 km/h	Palangre
<i>M. henlei</i>	♂ 52-66 ♀ 51-63	95	Sin dato	Palangre
Teleósteos				
<i>K. audax</i>	~140	420	80 km/h	Al curricán
<i>C. hippurus</i>	♂ ~42 ♀ ~50	210	56 km/h	Anzuelo
<i>T. macdonaldi</i>	♂ 120 ♀ 130	200	Sin dato	Anzuelo

Datos recopilados de Cailliet y Goldman, 2004; Cisneros-Mata *et al.*, 1995; Fischer *et al.*, 1995; Froese y Pauly, 2009.

6.4 Análisis de muestras

6.4.1 Producción de ERO, determinación de Radical Superóxido

La producción endógena de $\text{O}_2^{\cdot-}$ se cuantificó mediante un método fotolorimétrico indirecto y discontinuo, siguiendo la reducción de ferricitocromo C

por el $O_2^{\cdot-}$ durante un intervalo de tiempo fijo (Markert *et al.*, 1984; Drossos *et al.*, 1995). Se tomaron 100 mg de tejido húmedo y se colocaron en solución amortiguadora de Krebs fosfato (0.11 M NaCl, 0.0047 M KCl, 0.012 M $MgSO_4$, 0.012 M NaH_2PO_4 , 0.025 M $NaHCO_4$ y 0.001 M glucosa). Se adicionó citocromo C (15 μ M) a cada muestra y se incubó en un baño de agua a 37°C con agitación por 15 minutos. Posteriormente, se retiraron las muestras del baño y se les agregó N-etilmaleimida (3mM) para detener la reducción del citocromo C. Se centrifugó a 955.8 x g (3,000 rpm) a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a una celda y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis, Reino Unido) a 550nm (ΔA_{550}). Los blancos de cada muestra se realizaron retirando el remanente del sobrenadante en los tubos y adicionando solución amortiguadora de Krebs, N-etilmaleimida y citocromo C, para posteriormente incubarse a 37°C, centrifugar a 955.8 x g (3,000 rpm) a 4°C durante 10 minutos y medir la absorbancia del sobrenadante a 550 nm (ΔA_{550}). Los datos fueron expresados en nmol $O_2^{\cdot-}$ por mg de proteína por minuto.

6.4.2 Antioxidantes enzimáticos

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se pesaron 100 mg de tejido por muestra y se homogenizaron en frío en solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5). Se centrifugaron a 2,124 x g (3,000 rpm) durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y procedió con los análisis enzimáticos a una temperatura de $25 \pm 2^\circ C$ en el laboratorio.

6.4.2.1 Superóxido Dismutasa

Para medir la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) se utilizó el método propuesto por Suzuki (2000) generando $O_2^{\cdot-}$ de manera constante mediante el sistema xantina/xantina oxidasa. El $O_2^{\cdot-}$ al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce, formando así un compuesto llamado

formazán; un cambio en la absorbancia es detectado cuando la SOD inhibe la reducción del NBT. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la reacción máxima de $O_2^{\cdot-}$ con el NBT. En una celda de plástico se mezclaron 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^{-1} ; sulfato de amonio 2 M) y la muestra o solución para homogenizar en el caso del blanco. Se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos en un espectrofotómetro (Beckman coulter DU 800) a 560 nm (ΔA_{560}). La actividad enzimática se expresó en unidades de SOD por mg de proteína.

6.4.2.2 Catalasa

Se determinó la actividad enzimática de la catalasa (CAT) midiendo el decremento en la concentración de H_2O_2 a 240 nm, según la metodología propuesta por Aebi (1984). Las muestras se diluyeron con solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5). Los reactivos se mantuvieron en un baño de agua a 25°C. La solución de trabajo se preparó en fresco utilizando H_2O_2 (20 M) y solución amortiguadora de fosfatos (100 M). En una celda de cuarzo se mezcló solución de trabajo con la muestra y se registró el cambio en la absorbancia a 240 nm (ΔA_{240}) cada 15 segundos durante 3 minutos en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a 240 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades de CAT por mg de proteína. Una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir $1 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 por minuto.

6.4.2.3 Glutación Peroxidasa

Para medir la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se utilizó el método propuesto por Folh  y G nzler (1984) midiendo el decremento del dinucle tido de nicotinamida y adenina fosforilado reducido (NADPH) al mantener

constantes los niveles de GSH. En una celda de cuarzo se mezcló solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), solución de azida de sodio (20 mM), glutatión reductasa (15 U mL⁻¹), NADPH (1.5 mM), agua desionizada fría, GSH (250 mM), la muestra, H₂O₂ (10 mM) y se registró el cambio en la absorbancia cada 3 segundos durante 40 segundos en un espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis) a 340 nm (ΔA_{340}). Los resultados se expresaron en U por mg de proteína. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de GSH a glutatión oxidado (GSSG) por minuto.

6.4.2.4 *Glutatión Reductasa*

La actividad catalítica de la enzima glutatión reductasa (GR) se determinó midiendo el decremento en la absorbancia durante la oxidación del NADPH siguiendo la metodología propuesta por Goldberg y Spooner (1987). Todas las soluciones se mantuvieron en hielo a excepción de la solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2). En una celda de cuarzo se mezcló solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), NADPH (2mM), agua desionizada, la muestra, GSSG (10 mM) y se registró el cambio en la absorbancia durante 60 segundos en un espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis) a 340 nm (ΔA_{340}). Los resultados se expresaron en unidades por mg de proteína. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de GSSG a GSH por minuto.

6.4.2.5 *Glutatión-S-Transferasa*

La actividad de la GST se determinó midiendo la aparición del complejo tioéter glutatión dinitrobenzeno a 340 nm, como producto de la unión del GSH con 1-cloro 2, 4-dinitrobenzeno (CNDB) siguiendo la metodología propuesta por Habig y Jakoby (1981). En una celda de cuarzo se mezcló solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.0), GSH (10 mM), EDTA (60 mM), CNDB (10 mM) y 10 μ L de

la muestra y se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante 6 minutos en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) a 340 nm (ΔA_{340}). Los resultados se expresaron en unidades por mg de proteína. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1 μmol de CNDB por minuto.

6.4.2.6 Determinación de proteínas totales

Para estandarizar los datos se determinó la cantidad de proteínas solubles utilizando un kit comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA., E.U.A.) adaptado para microplaca, basándose en el método descrito por Bradford (1976). Se utilizó el colorante azul de Coomassie® que, en respuesta a la concentración de proteínas, reacciona con los residuos de amino ácidos básicos, especialmente arginina, presentes en la muestra. Las muestras fueron diluidas 1:100 con solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM). Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (ASB) en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.2 mg mL⁻¹. En cada pozo de una microplaca se mezclaron agua destilada, colorante de Bradford y la muestra o albúmina en el caso de la curva estándar. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se tomó lectura a una absorbancia de 590 nm (ΔA_{590}) en un analizador semiautomático (Microlab 300, Vital Scientific, Países Bajos). Los resultados se expresaron en mg de proteína por mL.

6.4.3 Antioxidantes no enzimáticos

6.4.3.1 Vitamina C

La vitamina C o ácido L-ascórbico (AA) es una vitamina hidrosoluble antioxidante que está presente en la fase acuosa extracelular. Junto con el α -tocoferol protege las membranas celulares contra la peroxidación de lípidos. El método de

determinación consiste en la extracción del AA en condiciones que minimicen su deterioro, utilizando una solución de ácido metafosfórico y EDTA que protegen al AA de la oxidación por aire y luz (Carvajal *et al.*, 1997; Ledezma-Gairard, 2004; Agilent Technologies Company, 2001).

Se pesaron por triplicado 400 mg de muestra fresca en tubos eppendorf y se homogenizaron inmediatamente con 1 mL de solución de extracción (ácido metafosfórico 3% y EDTA, 1:1) en un homogenizador (Politron 3100). Durante este proceso las muestras se mantuvieron en hielo. Posteriormente, se dejó reposar la muestra durante 40-60 minutos a 4°C y se centrifugó durante 15 minutos a 4°C a 11,947.5 x g (15,000 rpm). Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de membrana de nylon o acetato de celulosa con la ayuda de una jeringa de 3 mL. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su análisis por un tiempo no mayor a 24 hrs. Para el análisis, se inyectaron al HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia) los estándares y las muestras, donde se separa el analito de interés utilizando una columna BDS y un sistema de fases de separación por gradiente detectadas a 245 nm (ΔA_{245}) (detector PDA) en un tiempo de retención de 6.7 minutos y un espectro de 243.8 nm ($\Delta A_{243.8}$). Como curva de calibración se usó una solución de vitamina C en dilución seriada a partir de una concentración de 200 ng μL^{-1} . Con base en el área de cada pico y la curva estándar se calculó la concentración de vitamina C en cada muestra.

6.4.3.2 Vitamina E

Se pesaron por triplicado 400 mg de muestra fresca en frascos de vidrio, se adicionó sulfato de sodio anhidro e inmediatamente se homogenizaron con hexano, etanol y agua destilada en un homogenizador (Politron 3100) por 1 min. Posteriormente, se adicionó solución de BHT, se agitó la muestra y se centrifugó a 472 x g (2,000 rpm) a 10°C por 10 min. Después del centrifugado, se recuperó el sobrenadante y se evaporó en un evaporador Labconco entre 35 y 45°C. El precipitado fue sometido nuevamente a extracción adicionando hexano. Se

centrifugó y se recuperó el sobrenadante, el cual fue colocado en el tubo de centrifuga junto con el primer extracto. La mezcla de extractos se colocó en el evaporador de 30 a 40 min y se llevó a 1 mL, posteriormente se evaporó en su totalidad con nitrógeno gaseoso. Al concentrado se le adicionó etanol, pirogalol e hidróxido de potasio. Se colocaron los tubos a 65°C por 25 min. Después de este tiempo se sacaron y se enfriaron.

Una vez fríos los tubos, se adicionaron a la mezcla BHT, hexano, agua destilada y se agitaron al vortex. Después de recuperar la fase de hexano se volvió a hacer un lavado del pellet con hexano, de nuevo se recuperó la fase de hexano y la mezcla de extractos fue filtrada a través de filtros de acetato de celulosa de 0.45 μm y se colocaron los tubos en el evaporador Labconco de 20 a 30 min para posteriormente terminar de ser evaporados con nitrógeno gaseoso. Finalmente, el extracto lipídico fue diluido en 200 μL de acetonitrilo para su análisis. Se pueden almacenar las muestras en viales ámbar a -20°C por no más de 24 hrs. Para el análisis de las muestras se utilizó una columna hypersil BDS C8 empleando una fase móvil y un detector UV/Visible con una absorbancia de 290 nm (ΔA_{290}). Para el análisis cromatográfico se usó acetonitrilo:agua. Para realizar la cuantificación de la vitamina se empleó una curva estándar de acetato DL- α -tocoferol (1, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). Con el área de los picos y la curva estándar se calculó la concentración de vitamina E en las muestras (Alava *et al.*, 1993).

6.4.4 Capacidad antioxidante total

Esta técnica se basa en la capacidad antioxidante de un extracto de tejido, estimada a través de su capacidad para desactivar radicales libres; en este caso se empleó 2, 2 difenilpicril hidracilo (DPPH*) (Brand-Williams, *et al.* 1995) Se preparó una mezcla de solventes para realizar la extracción, acetona: metanol: agua (5:3:2); se usó 1 mL de esta solución por cada 100 mg de tejido. Las muestras fueron homogenizadas en frío y protegidas de la luz, posteriormente se

colocaron en agitación por una hora y finalmente se obtuvo el sobrenadante (extracto) sin restos de tejido. Se preparó el DPPH[•] a una concentración de 0.125 mM en metanol y una curva estándar de ácido gálico (0-50 µM). La reacción se llevó a cabo por triplicado en microplacas de 96 pozos adicionando 50 µL de la muestra y la solución de DPPH[•]. Como blanco se empleó la solución de DPPH[•] sin extractos. La mezcla de la reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos. Se midió la absorbancia de las muestras en un lector de microplaca a 530 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción a partir de la reacción entre el radical DPPH[•] y los compuestos antioxidantes del tejido resultando en su forma reducida (DPPH-H).

6.4.5 Daño Oxidativo

6.4.5.1 Peroxidación de lípidos

Se cuantificó la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como un indicador de la peroxidación de lípidos, siguiendo el método propuesto por Okhawa (1979) y modificado por Persky (2000). Los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos resultantes de la peroxidación de lípidos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar malondialdehído (MDA), que es un pigmento rosa cristalino con absorción máxima a 532-535 nm (Persky *et al.*, 2000).

Se tomaron 100 mg de tejido y se homogenizaron en frío en solución para homogenizar 50 mM (amortiguador de fosfatos, EDTA y agua desionizada). Se tomaron 250 µL del homogenizado y se incubaron en un baño de agua a 37°C con agitación durante 15 minutos, una vez transcurrido este tiempo se colocaron en un baño de hielo, se adicionó ácido tricloroacético al 20% (en HCl 1M) y TBA al 1% . Las muestras se colocaron en un baño de agua con agitación a 90°C durante 10 minutos y se centrifugaron a 955.8 x g (3,000 rpm) durante 15 minutos a 4°C. Se desechó el precipitado y se tomó la lectura del sobrenadante. Se tomó lectura de una curva estándar de 1-bis tetraetoxipropano (TEP) en paralelo con las muestras

y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800, USA) calibrado a 560 nm (ΔA_{560}). La concentración de TBARS se calculó a partir de la curva estándar y se expresó en nmoles de TBARS por mg de proteína soluble.

6.4.5.2 Carbonilos proteicos

Los derivados carbonilados de las proteínas se forman a partir de reacciones en las que interactúan los aldehídos procedentes de la lipoperoxidación o de la oxidación de carbohidratos con proteínas. La cuantificación de estos carbonilos proteicos se hizo derivándolos con 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH), precipitándolos con ácido tricloroacético (TCA) y midiendo la absorbancia máxima entre 340 y 410 nm ($\Delta A_{340-410}$) (Levine *et al.*, 1994; Stadtman y Levine, 2000). Se tomaron 100 mg de tejido y se homogenizaron (1:20 peso:volumen) en ácido sulfosalicílico al 5%. El volumen del homogenizado fue dividido en dos partes y colocado en tubos ependorff etiquetados como muestra y blanco. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 23,895 x g (15,000 rpm) a 4°C y, finalmente, se desechó el sobrenadante.

En la campana de extracción, se adicionó a la muestra DNPH (10mM) y al blanco ácido clorhídrico (HCl, 2M), se agitaron en el vórtex durante 40 segundos y se incubaron una hora a temperatura ambiente agitando en el vórtex durante 40 segundos cada 15 minutos. A cada tubo se adicionó ácido tricloroacético (TCA, 20%) y se centrifugaron 5 minutos a 23,895 x g (15,000 rpm) a temperatura ambiente; se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol:acetato de etilo (1:1), se centrifugó una vez más por 5 minutos a 23,895 x g (15,000 rpm) a temperatura ambiente; se repitió tres veces este procedimiento de lavado y, finalmente, se adicionó a cada tubo clorato de guanidina, se agitó en el vórtex y se incubó en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos; se centrifugó por 5 minutos a 23,895 x g (15,000 rpm) a temperatura ambiente.

Tanto para muestras como blancos, se colectó el sobrenadante en celdas de plástico. Se hizo un barrido en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800) entre 340 y 410 nm ($\Delta A_{340-410}$) y se registró la absorbancia máxima a la máxima longitud de onda. Los resultados obtenidos se expresaron en μ moles de carbonilos proteicos por gramo de tejido (Levine *et al.*, 1994; Stadtman y Levine, 2000).

6.4.5.3 Daño al ADN

Para el aislamiento de ADN, se usaron 300 mg de tejido suspendidos en 400 μ L de buffer de lisis (100 mM Na-Cl, 50 mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS) con 10 μ L de proteinasa K (20 mg mL⁻¹), se colocaron en un baño a una temperatura de 65°C durante una noche; posterior a este tratamiento se sometió a las muestras a molido mecánico con el uso de pistilos. Se agregaron 200 μ L de NaCl (6 M) a cada muestra y se agitaron vigorosamente, posteriormente se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 8944 x g (10000 rpm), se recuperó el sobrenadante y se desechó el debris celular; se le dio tratamiento al sobrenadante con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (v/v) para eliminar el exceso de lípidos y proteínas, se agitó y centrifugó por 5 minutos a 12879.36 x g (12000 rpm); se recuperó la fase acuosa y se agregó alcohol absoluto frío (se agitó lentamente para observar las hebras de ADN). Las muestras fueron incubadas a -20°C por 30 minutos, posteriormente fueron centrifugadas por 10 minutos a 17530.24 x g (14000 rpm); se lavó el pellet de ADN con etanol (70%) y se centrifugó por 10 minutos a 17530.24 x g (14000 rpm).

Se dejaron evaporar los restos de etanol en las muestras por 10 minutos después de desechar el sobrenadante; se resuspendió el pellet en 30 μ L de agua grado molecular y se agregó RNAasa (1 μ g μ L⁻¹), se colocaron los tubos con el extracto de ADN en un baño a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Se determinó la concentración de ADN en un nanofotómetro a una absorbancia de 260 nm.

Una vez que se aisló el ADN de las muestras, se detectó y cuantificó el compuesto 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG), que se forma ante la exposición a radicales libres y originado por daño oxidativo, por medio de un kit comercial (Trevigen, Inc. Helgerman, Gaithersburg) para pruebas de ELISA (Wood *et al.*, 1990).

6.5 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad, homocedasticidad y se evaluó que no existiera correlación entre medias y varianza, dado que los datos obtenidos no cumplían estos parámetros se realizaron análisis estadísticos no paramétricos. Así mismo se realizó un análisis multivariado para el total de variables analizadas. Se determinó para cada una de las variables si existían diferencias entre grupos de peces de acuerdo a las características de nado y actividad física de cada una de las especies estudiadas, por medio de pruebas de hipótesis de Mann-Whitney (Durán *et al.*, 2003).

También se determinó si existían diferencias entre las especies de cada uno de los grupos considerando sus características de nado y actividad física por medio de la prueba de Kruskal-Wallis (Durán *et al.*, 2003). Finalmente, se realizó un análisis de discriminantes para determinar los posibles agrupamientos entre las especies y las variables que juegan el papel más importante en la respuesta antioxidante y daño oxidativo (Durán *et al.*, 2003). Para las variables donde se encontraron concentraciones por debajo del límite de detección establecido, se empleó el método de sustitución simple de valores (Helsel, 1990).

7. RESULTADOS

Se colectaron muestras de músculo de la parte caudal de las seis especies consideradas en este estudio (elasmobranquios; tiburón mako (*I. oxyrinchus*, N = 20), tiburón azul (*P. glauca*, N = 29) y tiburón mamón (*M. henlei*, N = 15), y para

teleósteos; marlín rayado (*K. audax*, N = 30), dorado (*C. hippurus*, N = 27) y totoaba (*T. macdonaldi*, N = 30)). Los datos biométricos de las especies muestreadas se resumen en la tabla III.

Tabla III. Especies de estudio para cada grupo de peces, número de organismos colectados (N), proporción de sexos por especie, talla (LT, longitud total (cm); Lm-f, longitud maxilar-furcal (cm); nd, no determinado), lugar de colecta.

Grupo	Especie	N total, n por sexo, LT	Lugar de colecta
Elasmobranquios	<i>Isurus oxyrinchus</i>	N=20 (12 ♀, 7 ♂, 1 nd) LT: 83-190 cm	Punta Lobos, Sn. Lázaro
	<i>Prionace glauca</i>	N=29 (17 ♀, 10 ♂, 2 nd) LT: 114-267 cm	Punta Lobos, Sn. Lázaro
	<i>Mustelus henlei</i>	N=15 (10 ♀, 5 ♂) LT: 72-98 cm	Punta Lobos
Teleósteos	<i>Kajikia audax</i>	N=30 (9 ♀, 20 ♂, 1 nd) L m-f: 161-221 cm	Cabo San Lucas
	<i>Coriphaena hippurus</i>	N=27 (18 ♀, 7 ♂, 2 nd) LT: 47-135 cm	Ensenada de Muertos, El Sargento, Punta Lobos
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	N= 30 (14 ♀, 10 ♂, 9 nd) LT: 61-86 cm	Bahía de San Luis Gonzaga (Alto Golfo de California)

7.1 Producción de ERO, determinación de radical superóxido

Los datos de la producción endógena de $O_2^{\cdot-}$ en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 8. La producción de $O_2^{\cdot-}$ fue mayor en el grupo de teleósteos ($p = 0.0001$) en comparación con los elasmobranquios. Dentro de los elasmobranquios se observó mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en *M. henlei* que en *I. oxyrinchus* ($p = 0.0001$) y *P. glauca* ($p = 0.0001$). En teleósteos hubo menor producción de $O_2^{\cdot-}$ en *T. macdonaldi* que en *K. audax* ($p = 0.0001$) y *C. hippurus* ($p = 0.0001$). Entre las especies de mayor actividad física, la producción de $O_2^{\cdot-}$ fue

mayor en el teleósteo *K. audax* ($p = 0.0001$) en comparación con *I. oxyrinchus*, y para las especies de actividad física intermedia, *C. hippurus* presentó mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ comparado con *P. glauca* ($p = 0.0001$).

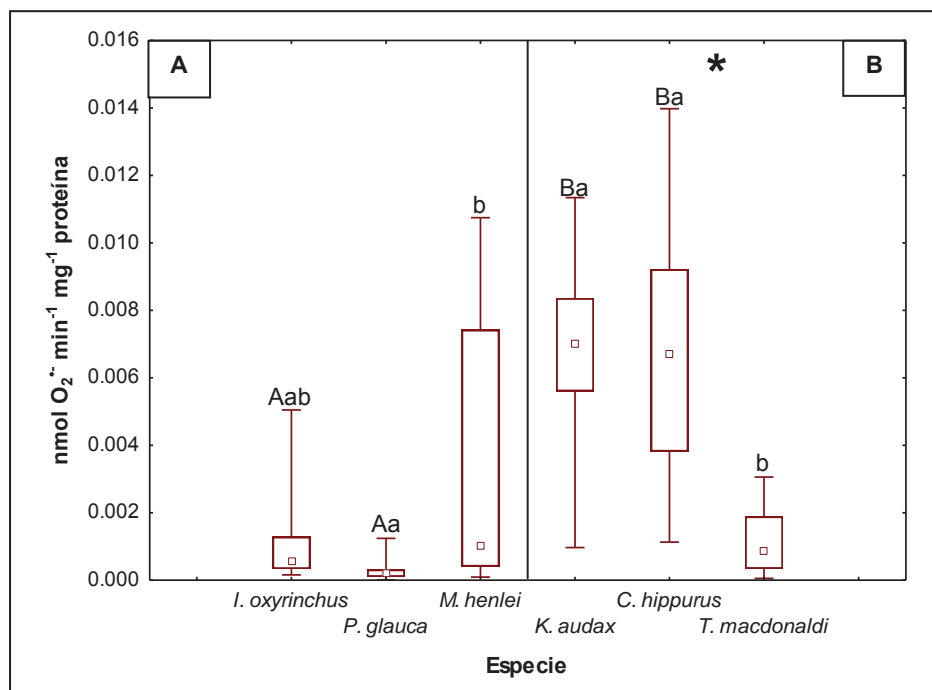


Figura 8. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$ nmol min^{-1} mg^{-1} proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como medianas, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.2 Sistema antioxidante enzimático

7.2.1 Actividad de superóxido dismutasa

Los datos de la actividad de SOD en músculo de las seis especies muestreadas se resumen en la figura 9. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la actividad de SOD entre los dos grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos). En el grupo de elasmobranquios se observó mayor actividad de SOD en *P. glauca* en comparación con *I. oxyrinchus* ($p = 0.03$). En teleósteos, *T.*

macdonaldi presentó menor actividad de esta enzima en comparación con *C. hippurus* ($p = 0.003$) y *K. audax* ($p = 0.002$). En las especies de mayor actividad física, *K. audax* presentó mayor actividad de SOD ($p = 0.02$) en comparación con *I. oxyrinchus*; en el caso de las especies de menor actividad física, se observó mayor actividad de SOD en *M. henlei* ($p = 0.01$) que en *T. macdonaldi*.

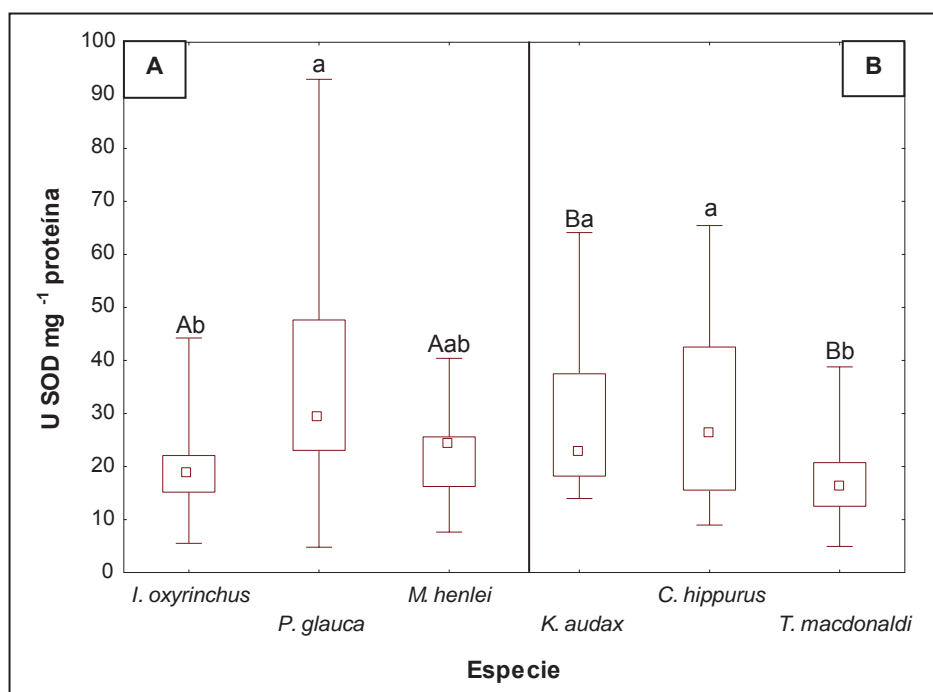


Figura 9. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.2.2 Actividad de catalasa

Los datos de la actividad de CAT en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 10. La actividad de CAT estuvo por debajo del límite de detección (0.5 U mg⁻¹ proteína) en el 80% de las muestras de *I. oxyrinchus*, 72% de *P. glauca*, 67% de *M. henlei*, 34% de *K. audax*, 37% de *C. hippurus* y en 67% de *T. macdonaldi*. Sin embargo, a nivel de grupo la actividad de esta enzima fue

mayor en teleósteos ($p = 0.0005$) que en elasmobranquios. No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre las especies de elasmobranquios ni entre teleósteos. En las especies de mayor actividad física, la actividad de CAT fue mayor en *K. audax* ($p = 0.0006$) que en *I. oxyrinchus*.

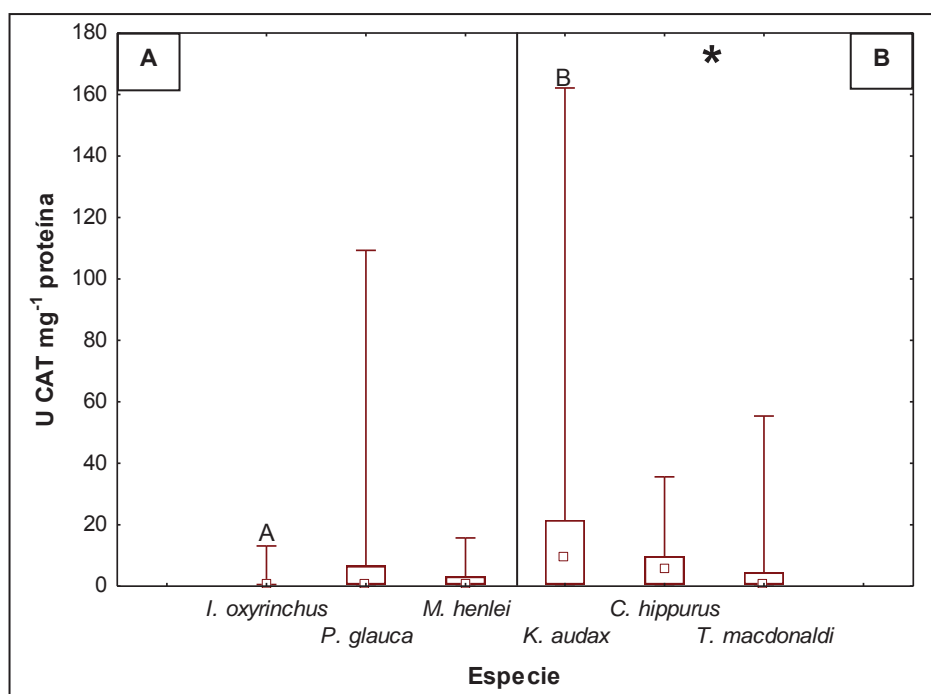


Figura 10. Actividad de la enzima catalasa (CAT, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.2.3 Actividad de glutatión peroxidasa

Los resultados de la actividad de GPx en músculo de las seis especies muestreadas se resume en la figura 11. La actividad de GPx fue mayor en elasmobranquios que en teleósteos ($p = 0.0001$). En elasmobranquios la actividad de esta enzima fue mayor ($p = 0.004$) en *P. glauca* que en *M. henlei*. Dentro del grupo de teleósteos *C. hippurus* presentó menor actividad de GPx en comparación con *K. audax* ($p = 0.0001$) y *T. macdonaldi* ($p = 0.01$). Para los organismos de

actividad física intermedia *P. glauca* presentó mayor ($p = 0.0001$) actividad de GPx en comparación con *C. hippurus*.

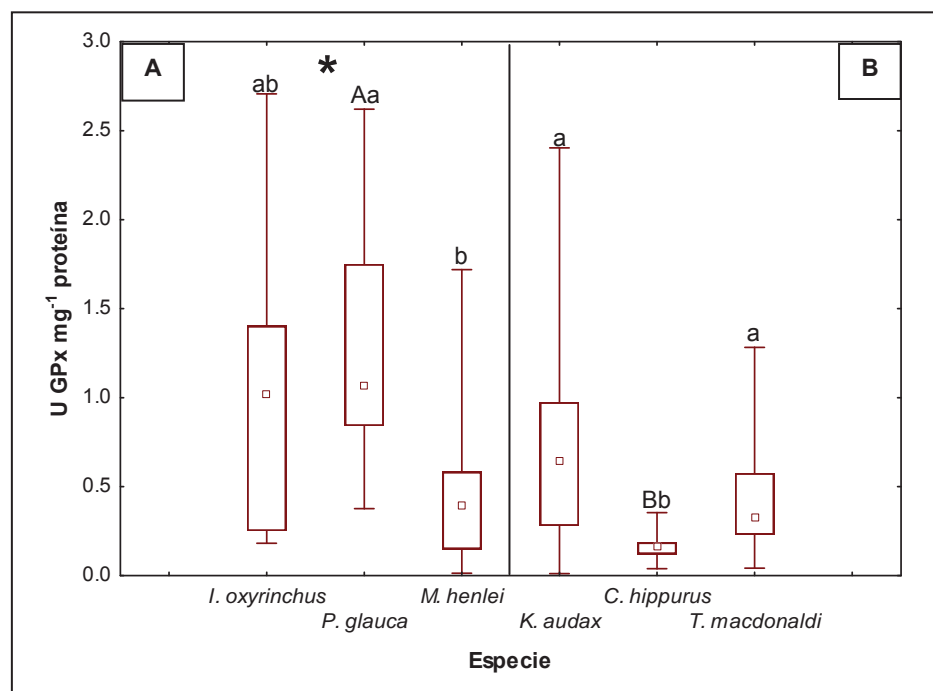


Figura 11. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.2.4 Actividad de glutatión reductasa

Los datos de la actividad de GR en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 12. No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en la actividad de esta enzima entre grupos de peces (elasmobranquios y teleósteos). En elasmobranquios no se observaron diferencias ($p > 0.05$) entre especies; mientras que en teleósteos la menor actividad de GR se observó en *C. hippurus* comparada con *K. audax* ($p = 0.02$) y *T. macdonaldi* ($p = 0.001$). Entre pares de especies de actividad física intermedia *C. hippurus* presentó menor ($p = 0.0006$) actividad de GR que *P. glauca*.

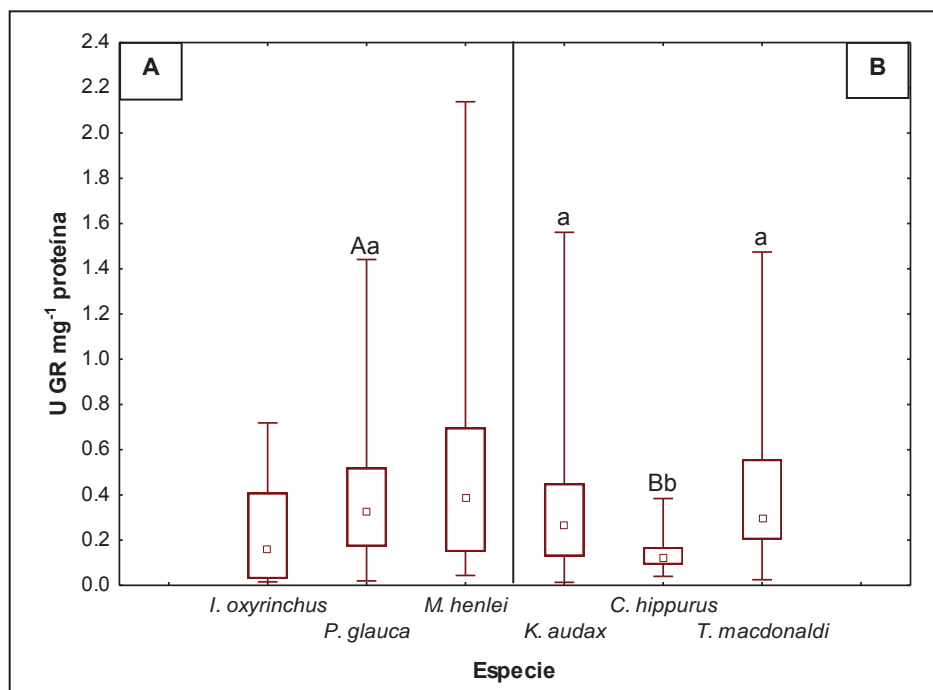


Figura 12. Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.2.5 Actividad de glutatión S-transferasa

Los resultados de la actividad de GST en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 13. La actividad de GST fue menor ($p = 0.006$) en el grupo de teleósteos en comparación con elasmobranquios. Entre especies de elasmobranquios no se encontraron diferencias en la actividad de esta enzima. En teleósteos, *K. audax* presentó mayor actividad de GST que *C. hippurus* ($p = 0.0001$) y *T. macdonaldi* ($p = 0.0001$). Entre las especies de mayor actividad física *K. audax* presentó mayor ($p = 0.03$) actividad de esta enzima en comparación con *I. oxyrinchus*; en las especies de actividad física intermedia, fue mayor en *P. glauca* ($p = 0.0001$) comparado con *C. hippurus* y, en las especies de

menor actividad física, *M. henlei* presentó mayor ($p = 0.01$) actividad de GST que *T. macdonaldi*.

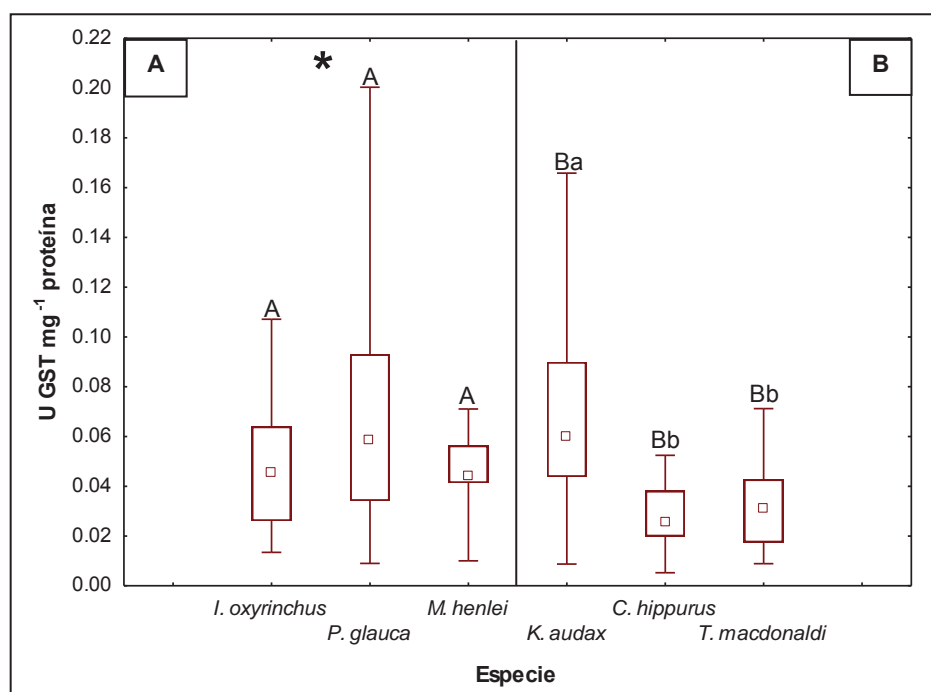


Figura 13. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST, U mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.3 Sistema antioxidante no enzimático

7.3.1 Vitamina C

Los datos de la concentración de vitamina C en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 14. La concentración de vitamina C fue mayor en el grupo de elasmobranquios ($p = 0.001$) en comparación con teleósteos. En elasmobranquios, *P. glauca* presentó mayores concentraciones de vitamina C en comparación con *I. oxyrinchus* ($p = 0.001$). En el caso de *M. henlei*, solamente un organismo presentó concentraciones detectables de vitamina C

($0.016 \mu\text{g g}^{-1}$); en el resto de los organismos de la especie, estuvieron por debajo del límite de detección ($0.01 \mu\text{g g}^{-1}$). En teleósteos, la concentración de vitamina C en *K. audax* y *T. macdonaldi* estuvo por debajo del límite de detección ($0.01 \mu\text{g g}^{-1}$). Para las especies de actividad física intermedia, fue *C. hippurus* la que presentó las mayores concentraciones de vitamina C ($p = 0.0001$) en comparación con *P. glauca*.

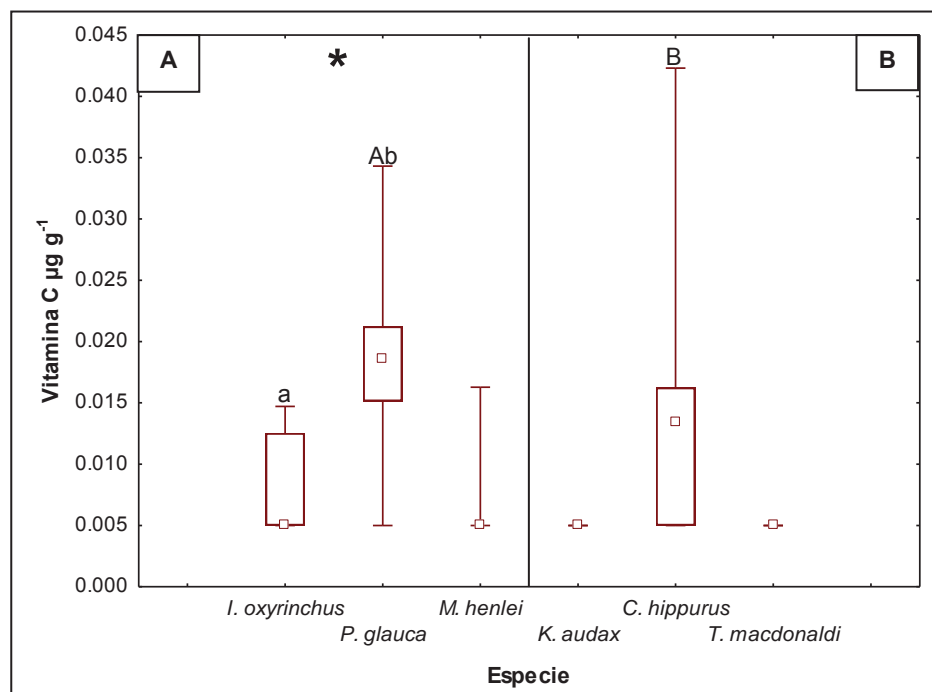


Figura 14. Concentración de vitamina C ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de (A) elasmobranchios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranchios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranchio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.3.2 Vitamina E

Los datos de la concentración de vitamina E en músculo de las seis especies muestreadas se resumen en la figura 15. La concentración de vitamina E fue mayor en elasmobranchios en comparación con los teleósteos ($p = 0.03$). Dentro del grupo de elasmobranchios, *M. henlei* presentó menor concentración de

vitamina E que *P. glauca* ($p = 0.001$) e *I. oxyrinchus* ($p = 0.01$). En teleósteos, la concentración de vitamina E fue menor en *T. macdonaldi* en comparación con *C. hippurus* ($p = 0.004$). Entre pares de especies con actividad física similar no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

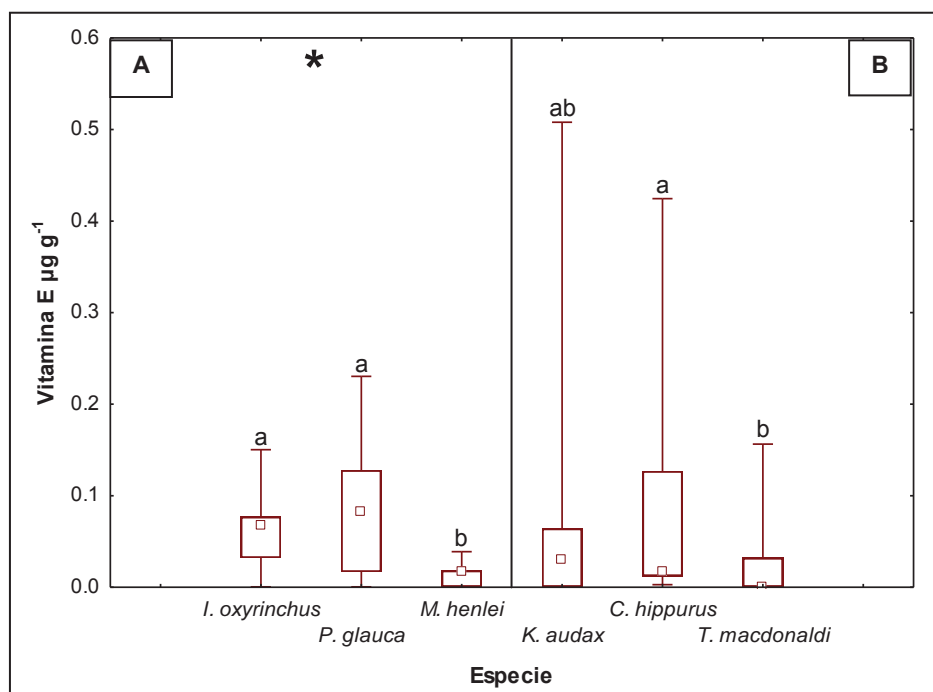


Figura 15. Concentración de vitamina E ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.4 Capacidad antioxidante total

Los resultados de la capacidad antioxidante total en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 16. El grupo de teleósteos presentó mayor capacidad antioxidante total en comparación con los elasmobranquios ($p = 0.0001$). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las especies de elasmobranquios. Dentro del grupo de teleósteos *K. audax* presentó mayor capacidad antioxidante respecto a *C. hippurus* ($p = 0.002$). Entre las especies de

mayor actividad física, se observó mayor capacidad antioxidante en el teleósteo *K. audax* en comparación con el elasmobranquio *I. oxyrinchus* ($p = 0.0001$); para las especies de menor actividad física, el teleósteo *T. macdonaldi* presentó mayor capacidad antioxidante que el elasmobranquio *M. henlei* ($p = 0.0001$).

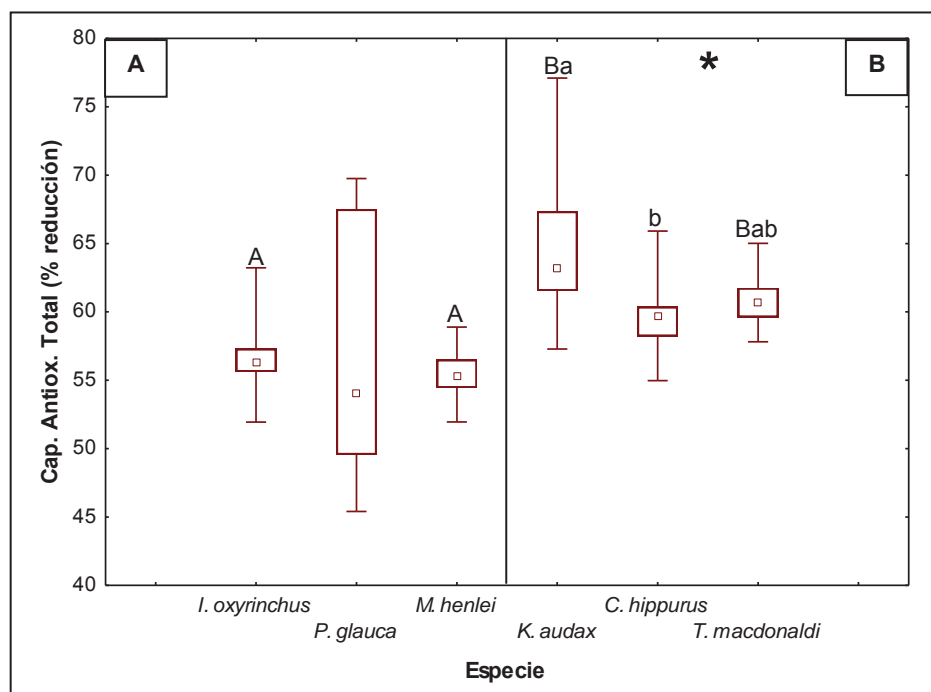


Figura 16. Capacidad antioxidante total (% reducción) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.5 Daño oxidativo

7.5.1 Peroxidación de lípidos

Los niveles de TBARS, como indicador de daño oxidativo a lípidos, en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 17. Las concentraciones más elevadas de TBARS se observaron para el grupo de elasmobranquios ($p =$

0.0001). En elasmobranquios, los niveles de TBARS en *P. glauca* fueron mayores en comparación con *M. henlei* ($p = 0.001$). En teleósteos, los niveles de TBARS en *K. audax* fueron mayores que en *T. macdonaldi* ($p = 0.0001$). Entre pares de especies, se observó mayor peroxidación de lípidos en *P. glauca* en comparación con *C. hippurus* ($p = 0.0001$), ambas especies de actividad física intermedia.

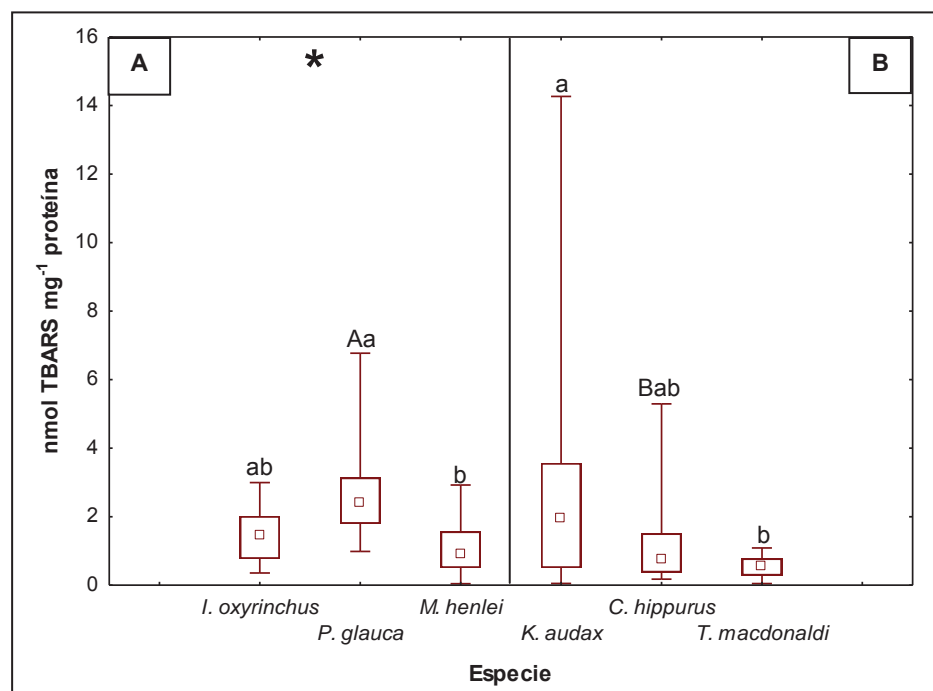


Figura 17. Peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg⁻¹ proteína) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.5.2 Carbonilos proteicos

Los datos de la concentración de carbonilos proteicos, como indicador de daño oxidativo a proteínas, en músculo de las seis especies muestreadas se presentan en la figura 18. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración de carbonilos proteicos entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos). En elasmobranquios, *P. glauca* presentó menores concentraciones

que *I. oxyrinchus* ($p = 0.0001$) y *M. henlei* ($p = 0.0001$). En teleósteos, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de carbonilos proteicos entre especies ($p > 0.05$). En las especies de mayor actividad física, se observó que *I. oxyrinchus* presenta mayor concentración de carbonilos proteicos que *K. audax* ($p = 0.03$); entre las especies de actividad física intermedia, *C. hippurus* presentó mayores niveles de carbonilos proteicos que *P. glauca* ($p = 0.0001$), y entre las especies de menor actividad física, la concentración de carbonilos proteicos fue mayor en *M. henlei* que en *T. macdonaldi* ($p = 0.0001$).

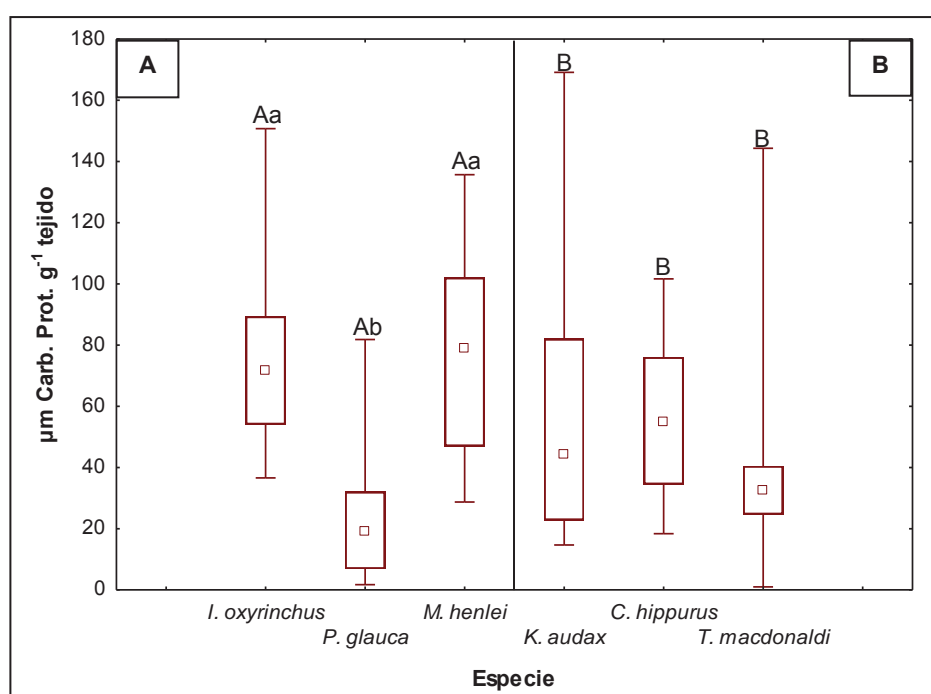


Figura 18. Carbonilos proteicos ($\mu\text{m g}^{-1}$ tejido) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.5.3 Daño al ADN

Los datos registrados por la medición de la concentración de 8-OHdG, como indicador de daño oxidativo al ADN, en músculo de las seis especies muestreadas

se presentan en la figura 19. Se encontró mayor concentración de 8-OHdG en el grupo de teleósteos que en elasmobranquios ($p = 0.01$). Entre las especies de elasmobranquios, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de 8-OHdG entre especies ($p > 0.05$). En teleósteos, se observó mayor concentración de 8-OHdG en *C. hippurus* que en *T. macdonaldi* ($p = 0.0001$). En las especies de mayor actividad física, se observó mayor concentración de 8-OHdG en *K. audax* en comparación con *I. oxyrinchus* ($p = 0.0001$); para las especies de actividad física intermedia, fue mayor en *C. hippurus* que en *P. glauca* ($p = 0.009$), y entre las especies de menor actividad física no se observaron diferencias significativas en la concentración de 8-OHdG ($p > 0.05$).

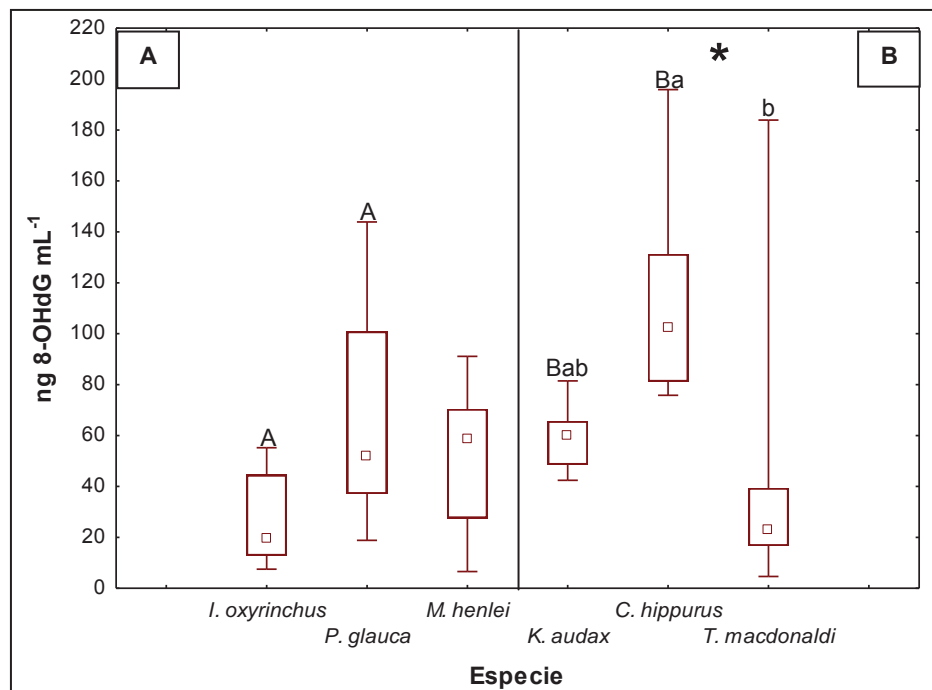


Figura 19. Concentración de 8-OHdG (8-OHdG, ng mL⁻¹) en músculo de (A) elasmobranquios y (B) teleósteos. Los datos se presentan como mediana, percentiles (25%-75%), valores mínimo y máximo. * Diferencias entre grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos); las letras minúsculas indican diferencias entre especies dentro de cada grupo; las letras mayúsculas indican diferencias entre pares de especies (elasmobranquio y teleósteo) con actividad física similar, $p < 0.05$.

7.6 Análisis discriminantes

7.6.1 Análisis discriminantes entre grupos, elasmobranquios y teleósteos

En el análisis se incluyeron 11 variables de las cuales 10 resultaron ser significativas (λ de Wilks = 0.0107, $F = 10.322$, $P < 0.0000$). En la tabla IV se presentan las raíces canónicas (funciones discriminantes) y su significancia. En la tabla V se muestran los coeficientes estandarizados para las variables canónicas, su contribución a la función discriminante (raíz) y los eigenvalores (raíces) para cada función. La primera raíz explica 55.12% de la varianza acumulada y la variable que más contribuye es la capacidad antioxidante total. La segunda raíz explica el 78.61% y las variables que más contribuyen son la concentración de vitamina E, niveles de TBARS, de carbonilos proteicos y de 8-OHdG. La tercera raíz explica el 89.87% y las variables de mayor contribución son la actividad de SOD y los carbonilos proteicos (esta última contribuye de manera importante en las raíces 2 y 3). La cuarta raíz explica el 97.5% y las variables de mayor contribución son la producción de $O_2^{\cdot-}$, la actividad de CAT y la actividad de GST. La quinta raíz explica el 100% de la varianza acumulada con la actividad de las enzimas GPx y GR como variables de mayor contribución.

En la figura 20 se observa que la primera función discriminante separa a los elasmobranquios de los teleósteos, los valores de las especies de elasmobranquios se observan a la izquierda del eje horizontal con medias negativas (*I. oxyrinchus* = -0.63, *P. glauca* = -4.37, *M. henlei* = -0.16), mientras que los valores de las especies de teleósteos están a la derecha del eje horizontal con medias positivas (*K. audax* = 2.46, *C. hippururus* = 1.0, *T. macdonaldi* = 1.68). Así mismo, se observa que la segunda función discriminante continúa separando a ambos grupos de peces (elasmobranquios vs. teleósteos).

Tabla IV. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas, para seis especies de peces, elasmobranquios y teleósteos.

Raíces eliminadas	Eigenvalor	Canonical R	Wilks' lambda	χ^2	d.f.	P
0	5.326	0.917	0.010	360.361	55	0.000000
1	2.269	0.833	0.068	213.700	40	0.000000
2	1.088	0.721	0.222	119.514	27	0.000000
3	0.741	0.652	0.464	60.979	16	0.000000
4	0.236	0.437	0.808	16.881	7	0.018174

Tabla V. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas, para seis especies de peces, elasmobranquios y teleósteos. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco.

Variable	Raíz 1	Raíz 2	Raíz 3	Raíz 4	Raíz 5
$O_2^{\cdot-}$	0.317	0.479	0.364	-0.833*	0.230
SOD	0.279	0.253	0.557*	0.135	0.043
CAT	-0.090	-0.013	0.105	0.237*	-0.206
GPx	-0.357	-0.078	-0.357	-0.214	0.479*
GR	0.195	-0.324	-0.200	-0.038	-0.718*
GST	-0.377	-0.160	-0.027	-0.466*	-0.224
Vitamina E	-0.183	0.578*	-0.385	0.191	0.165
Cap. antiox. total	0.801*	0.008	-0.528	0.066	0.231
TBARS	-0.204	0.480*	-0.434	-0.260	0.277
Carbonilos Proteicos	0.169	-0.742*	0.848*	0.073	0.202
8-OHdG	-0.198	0.533*	0.110	0.478	-0.339
Eigenvalor	5.326	2.269	1.088	0.741	0.236
V. E. A.	0.551	0.786	0.898	0.975	1.000

$O_2^{\cdot-}$, producción de radical superóxido; SOD, actividad de superóxido dismutasa; CAT, actividad de catalasa; GPx, actividad de glutatión peroxidasa; GR, actividad de glutatión reductasa; GST, actividad de glutatión-S-transferasa; TBARS, niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico como indicador de peroxidación lipídica; 8-OHdG, concentración de 8-hidroxi-2'-deoxiguanisina como indicador de daño al ADN; V.E.A., varianza explicada acumulada.

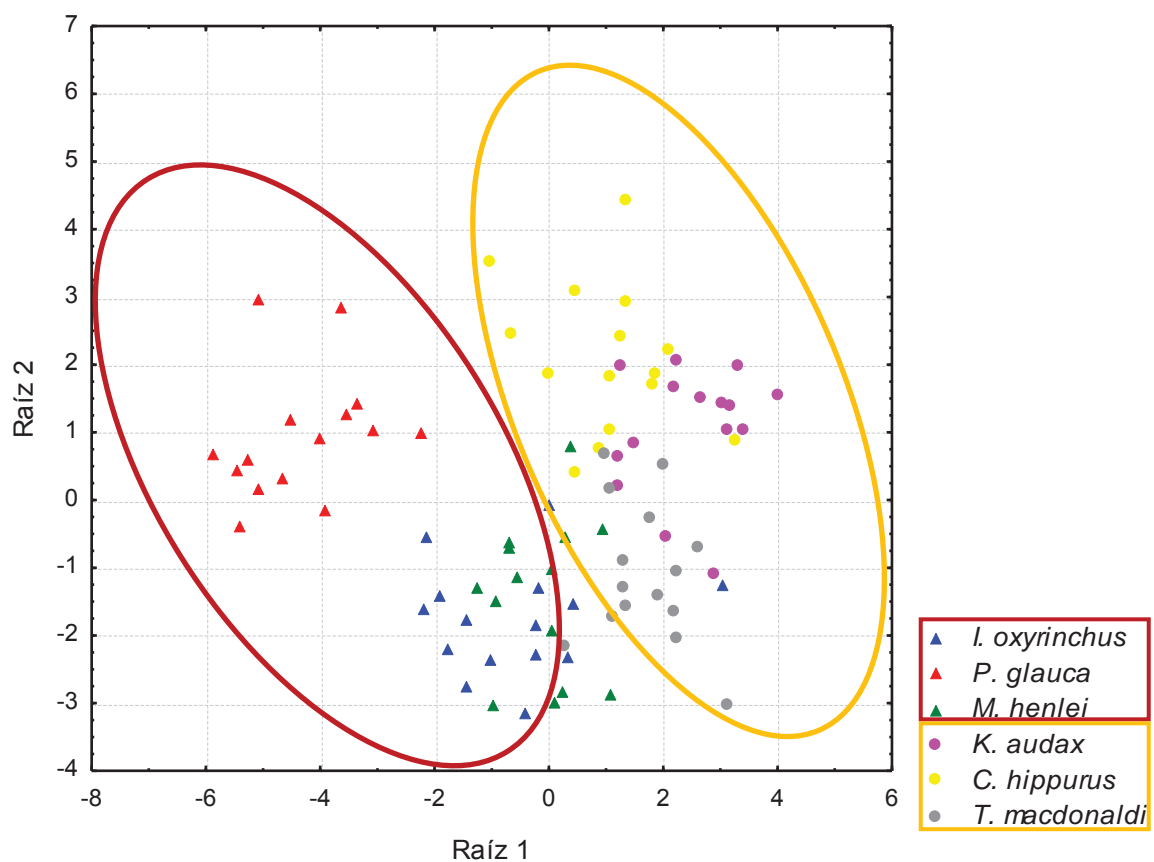


Figura 20. Diagrama de puntuajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) en 6 especies de peces, elasmobranquios (delimitados con línea roja) y teleósteos (delimitados con línea amarilla).

7.6.2 Análisis discriminantes en elasmobranquios

De las 11 variables incluidas en el análisis, 4 fueron significativas (λ de Wilks = 0.0471, $F = 10.158$, $P < 0.0000$). En la tabla VI se presentan las raíces canónicas y su significancia. En la tabla VII se muestran los coeficientes estandarizados para las variables canónicas, su contribución a la función discriminante y los eigenvalores para cada función. La primera raíz explica el 79.4% de la varianza acumulada y las variables que más contribuyen son la concentración de TBARS y de carbonilos proteicos. La segunda raíz explica el 100% de la varianza acumulada y las variables que más contribuyen son la concentración de vitamina E y la capacidad antioxidante total.

En la figura 21 se observa que la primera función discriminante separa a *P. glauca*, ésta se ubica a la izquierda del eje horizontal con media negativa de -3.4, mientras que las otras dos especies están a la derecha del eje horizontal con medias positivas (*I. oxyrinchus* = 1.20 y *M. henlei* = 2.36). La segunda función discriminante separa principalmente a *I. oxyrinchus* con media positiva de 1.66 de las otras dos especies de elasmobranquios, *P. glauca* con media negativa de -0.33 y *M. henlei* con media negativa de -1.42.

Tabla VI. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas para tres especies de peces, elasmobranquios.

Raíces eliminadas	Eigenvalor	Canonical <i>R</i>	Wilks' lambda	X^2	d.f.	<i>P</i>
0	6.728	0.933	0.047	109.948	22	0.000000
1	1.743	0.797	0.364	36.331	10	0.000074

Tabla VII. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas para tres especies de peces, elasmobranquios. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco.

Variable	Raíz 1	Raíz 2
$O_2^{\cdot-}$	0.109	0.015
SOD	0.125	-0.348
CAT	0.067	-0.435
GPx	-0.173	0.309
GR	0.175	-0.264
GST	-0.104	-0.115
Vitamina E	-0.550	0.710*
Cap. antiox. total	0.368	0.913*
TBARS	-0.733*	0.544
Carbonilos Proteicos	0.755*	-0.100
8-OHdG	-0.298	-0.513
Eigenvalor	6.728	1.743
V. E. A.	0.794	1.000

$O_2^{\cdot-}$, producción de radical superóxido; SOD, actividad de superóxido dismutasa; CAT, actividad de catalasa; GPx, actividad de glutatión peroxidasa; GR, actividad de glutatión reductasa; GST, actividad de glutatión-S-transferasa; TBARS, niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico como indicador de peroxidación lipídica; 8-OHdG, concentración de 8-hidroxi-2'-deoxiguanisina como indicador de daño al ADN; V.E.A., varianza explicada acumulada.

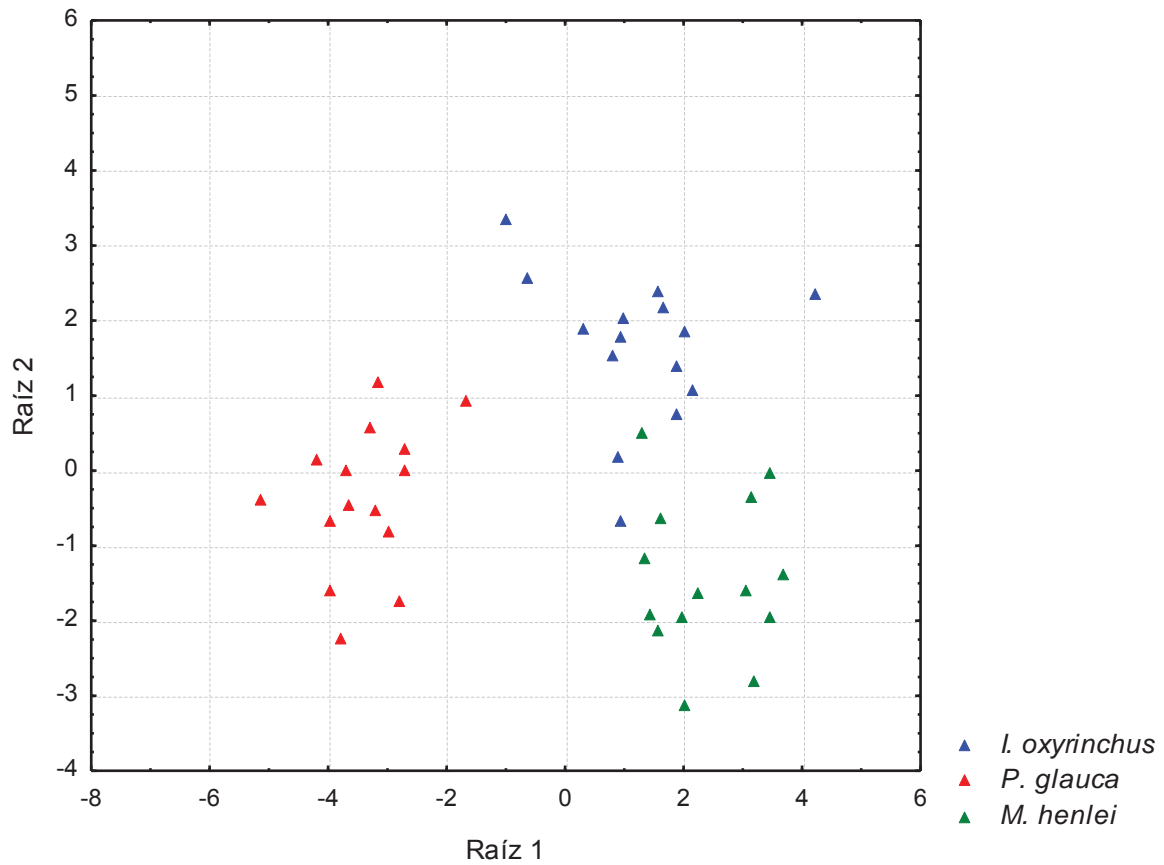


Figura 21. Diagrama de puntajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) en 3 especies de peces elasmobranquios.

7.6.3 Análisis discriminantes en teleósteos

Se consideraron 11 variables, de las cuales 3 fueron significativas (λ de Wilks = 0.0793, $F = 7.415$, $P < 0.0000$). En la tabla VIII se presentan las raíces canónicas y su significancia. En la tabla IX se muestran los coeficientes estandarizados para las variables canónicas, su contribución a la función discriminante y los eigenvalores para cada función. La primera raíz explica el 57.4% de la varianza acumulada y las variables que más contribuyen son la producción de O_2^- y la actividad de SOD. Con la segunda raíz se explica el 100% de la varianza acumulada y las variables que más contribuyen son la actividad de la GST y la concentración de 8-OHdG.

En la figura 22 se observa que la primera función discriminante separa a *T. macdonaldi*, esta especie se ubica a la derecha del eje horizontal con media positiva de 2.33, mientras que las otras dos especies están a la izquierda del eje horizontal con medias negativas (*K. audax* = -1.37 y *C. hippurus* = -0.96). La segunda función discriminante separa principalmente a *K. audax* con media negativa de -1.63 y *C. hippurus* con media positiva de 1.84.

Tabla VIII. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas para tres especies de peces, teleósteos.

Raíces eliminadas	Eigenvalor	Canonical R	Wilks' lambda	X ²	d.f.	P
0	2.951	0.864	0.079	93.738	22	0.000000
1	2.187	0.828	0.313	42.894	10	0.000005

Tabla IX. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas para tres especies de peces teleósteos. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco.

Variable	Raíz 1	Raíz 2
O ₂ ^{-•}	-1.105*	-0.536
SOD	-0.733*	0.064
CAT	0.437	0.394
GPx	-0.287	-0.480
GR	0.374	-0.193
GST	-0.160	-0.540*
Vitamina E	-0.077	0.153
Cap. antiox. total	0.140	-0.297
TBARS	-0.197	0.120
Carbonilos Proteicos	-0.030	-0.042
8-OHdG Daño al ADN	-0.267	0.524*
Eigenval	2.951	2.187
V. E. A.	0.574	1.000

O₂^{-•}, producción de radical superóxido; SOD, actividad de superóxido dismutasa; CAT, actividad de catalasa; GPx, actividad de glutatión peroxidasa; GR, actividad de glutatión reductasa; GST, actividad de glutatión-S-transferasa; TBARS, niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico como indicador de peroxidación lipídica; 8-OHdG, concentración de 8-hidroxi-2'-deoxiguanisina como indicador de daño al ADN; V.E.A., varianza explicada acumulada.

7.6.4 *Análisis discriminantes por actividad de nado*

En este análisis se incluyeron 11 variables, de las cuales 7 resultaron ser significativas (λ de Wilks = 0.2171, $F = 7.917$, $P < 0.0000$). En la tabla X se presentan las raíces canónicas y su significancia. En la tabla XI se muestran los coeficientes estandarizados para las variables canónicas, su contribución a la función discriminante y los eigenvalores para cada función. La primera raíz explica el 86.7% de la varianza acumulada y las variables que más contribuyen son la capacidad antioxidante total, los niveles de carbonilos proteicos y la concentración de 8-OHdG. La segunda raíz explica el 100% de la varianza acumulada y las variables que más contribuyen son la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la actividad de GPx.

En la figura 23 se observa que la primera función discriminante separa a los organismos de actividad física media a la derecha del eje horizontal con media positiva de 2.11; mientras que de lado izquierdo se encuentran las especies de actividad física alta con media negativa de -0.877 y los de actividad física baja con media negativa de -1.280. La segunda función discriminante separa a las especies de actividad física alta ubicadas en la parte superior del eje vertical con una media positiva de 0.755 de aquellas especies de actividad física media con una media negativa de -0.089 y de las de actividad física baja, con media negativa de -0.689.

Tabla X. Pruebas de chi cuadrada con raíces sucesivas eliminadas para pares de especies con actividad física similar.

Raíces eliminadas	Eigenvalor	Canonical <i>R</i>	Wilks' lambda	χ^2	d.f.	<i>P</i>
0	2.380	0.839	0.217	123.702	22	0.000000
1	0.362	0.515	0.734	25.038	10	0.005272

Tabla XI. Coeficientes estandarizados de las variables canónicas para pares de especies con actividad física similar. Las variables de mayor contribución en cada raíz están marcadas con asterisco.

Variable	Raíz 1	Raíz 2
O ₂ ⁻	-0.016	1.036*
SOD	0.169	-0.037
CAT	0.107	-0.320
GPx	0.035	0.615*
GR	-0.427	-0.563
GST	-0.174	0.032
Vitamina E	0.596	0.157
Cap. antiox. total	-0.601*	0.465
TBARS	0.393	0.502
Carbonilos Proteicos	-0.682*	-0.116
8-OHdG	0.725*	-0.494
Eigenval	2.380	0.362
V. E. A.	0.867	1.000

O₂⁻, producción de radical superóxido; SOD, actividad de superóxido dismutasa; CAT, actividad de catalasa; GPx, actividad de glutatión peroxidasa; GR, actividad de glutatión reductasa; GST, actividad de glutatión-S-transferasa; TBARS, niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico como indicador de peroxidación lipídica; 8-OHdG, concentración de 8-hidroxi-2'-deoxiguanisina como indicador de daño al ADN; V.E.A., varianza explicada acumulada.

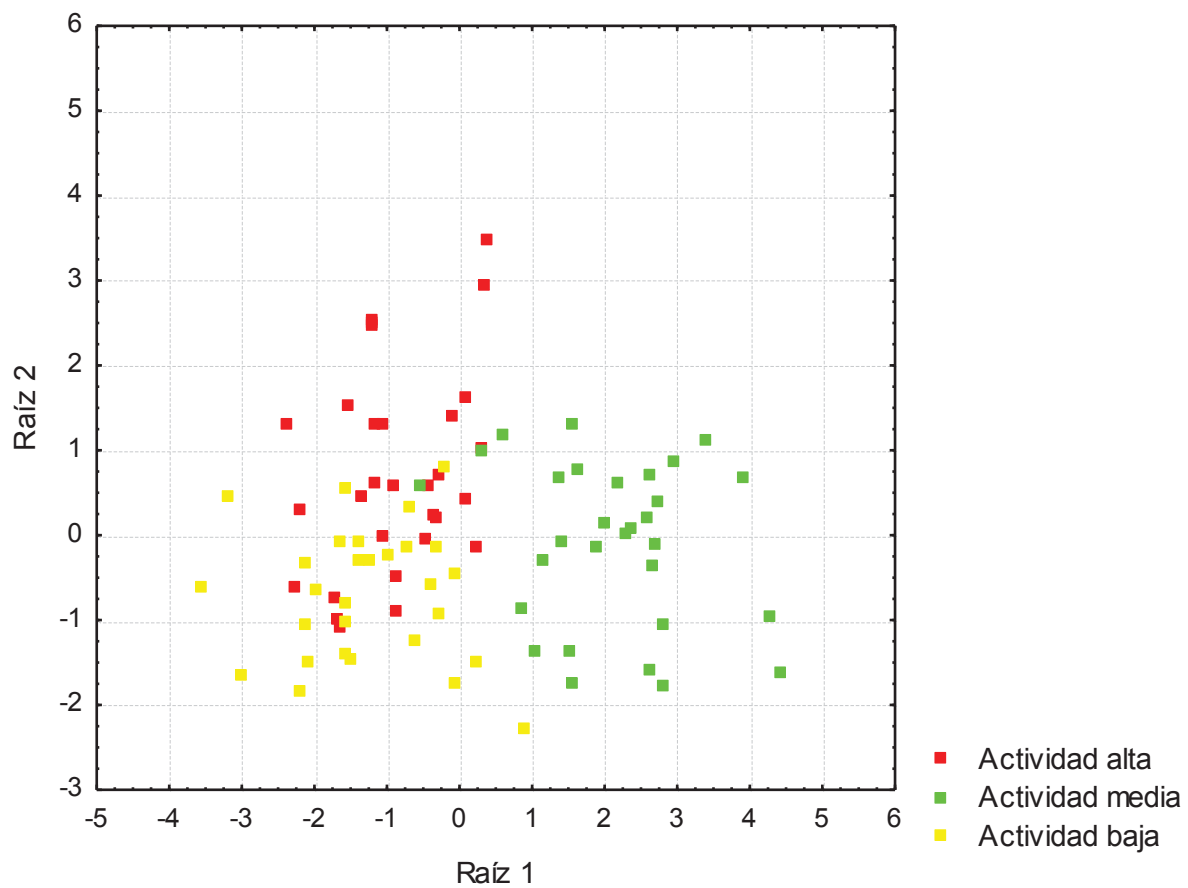


Figura 23. Diagrama de puntajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) entre pares de especies con actividad física similar.

8. DISCUSIÓN

8.1 Producción de radical superóxido

Las células producen continuamente radicales libres y ERO en diversos procesos como parte de su metabolismo basal. El ejercicio puede producir un desbalance entre la producción de ERO y los antioxidantes, lo que se conoce como estrés oxidativo (Ji, 1999). La actividad física incrementa la generación de ERO de diversas formas en el músculo esquelético (Ji, 1999; Urso, 2003). Dos del 5% del oxígeno usado en la mitocondria forma radicales libres (Urso, 2003). Una elevada tasa metabólica, como resultado del ejercicio, incrementa el consumo de oxígeno en los músculos ejercitados y otros tejidos; este incremento puede llegar a ser de hasta 100 veces en fibras musculares, resultando en un incremento proporcional en la producción de ERO (Storey, 1996; Ji, 1998, 1999; Urso, 2003).

La mayoría de los peces son termoconformadores y oxigenoconformadores, por lo que su tasa metabólica depende de la temperatura ambiental y de las variaciones del oxígeno en el medio (Wilhelm-Filho, 2007). La señalización por ERO puede tener un efecto protector que incrementa las oportunidades de supervivencia a los cambios en las concentraciones de oxígeno, preacondicionando a los organismos a resistir cambios subsecuentes (Das y Das, 2008; Krivoruchko y Storey, 2010a). Por lo tanto, la generación de ERO y el nivel de las defensas antioxidantes es interdependiente en estas especies (Wilhelm-Filho, 2007).

En el presente estudio, se observó la mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en el grupo de teleósteos en comparación con los elasmobranquios. Los elasmobranquios son osmoconformadores y, en el ambiente marino, retienen altas concentraciones de solutos, particularmente urea, para prevenir cambios osmóticos en los fluidos corporales. La retención de altas concentraciones de urea afecta a proteínas y la estructura de membranas con un impacto adicional en el metabolismo de lípidos, cuerpos cetónicos y aminoácidos (Ballantyne, 1997; Richards *et al.*, 2003).

Los elasmobranquios no son capaces de oxidar ácidos grasos en tejidos extrahepáticos como el músculo (Ballantyne, 1997). Ello es debido a la carencia de actividad detectable de la enzima L-carnitina (Watson y Dickson, 2001) y, por lo tanto, la inhabilidad de oxidar ácidos grasos de cadena larga en las mitocondrias (Moyes et al., 1992; Richards *et al.*, 2003). Los elasmobranquios utilizan cuerpos cetónicos como combustible lípidico (Zammit y Newsholme, 1979; Watson y Dickson, 2001; Richards *et al.*, 2003). La oxidación de ácidos grasos en el hígado produce cuerpos cetónicos que son liberados a la circulación para su oxidación en músculo (Moyes *et al.*, 1992). La oxidación de cuerpos cetónicos produce una cantidad menor de radicales libres, en comparación con la oxidación de glucógeno o creatina fosfato como sustratos para la síntesis de ATP durante la contracción muscular en ejercicio exhaustivo (Young *et al.*, 2007; Maalouf *et al.*, 2007; Paoli *et al.*, 2014). Además, se ha sugerido la importancia de los cuerpos cetónicos como combustible aeróbico en especies de tiburones activas (Richards *et al.*, 2003).

En el presente estudio, se consideraron como especies más activas a aquellas que, por las velocidades de nado que pueden alcanzar y por sus características específicas de vida (posición en la cadena trófica, medio en el que habitan), pueden llegar a tener un mayor esfuerzo físico (consumo de oxígeno, gasto energético) en la natación. Esto es, *I. oxyrinchus* y *P. glauca* entre los elasmobranquios y *K. audax* y *C. hippurus* entre los teleósteos.

Entre las especies de elasmobranquios, se observó una mayor producción de O_2^- en *M. henlei* en comparación con *I. oxyrinchus* y *P. glauca*. Esta especie es abundante en aguas templadas y tropicales, y se encuentra comúnmente en bahías poco profundas y cerradas, con fondos fangosos y arenosos (Rodríguez-Romero, 2013), siendo la especie menos activa de las 3 evaluadas. Los peces que toleran condiciones de anoxia o hipoxia sobreviven exitosamente en ambientes con bajas concentraciones de oxígeno, aunque pueden sufrir daño cuando hay un aumento de oxígeno; la cadena de transporte de electrones, que permanece

reducida bajo condiciones de hipoxia puede producir elevados niveles de ERO durante la reoxigenación o aumento en el consumo de oxígeno, lo que puede causar estrés oxidativo (Lushchak y Bagnyukova, 2006).

En el grupo de teleósteos, se observó una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en las especies de mayor actividad física (*K. audax* y *C. hippurus*). *K. audax* es un depredador oportunista, con hábitos generalistas, teniendo preferencia por los cardúmenes (Abitia-Cárdenas *et al.*, 2002). Esta especie realiza migraciones para su reproducción, se considera a Los Cabos un sitio inicial en su ruta migratoria para la obtención y almacenamiento de energía para la reproducción (Abitia-Cárdenas *et al.*, 2002; Sippel *et al.*, 2011; Abitia-Cárdenas *et al.*, 2012). Por lo anterior, se presupone que esta especie es capaz de desarrollar una elevada actividad física. *C. hippurus* es reconocida por su elevada tasa metabólica, sustentada en una gran capacidad de difusión del oxígeno a través de sus branquias (Olson y Galván-Magaña, 2002). No existen datos específicos sobre la producción de radicales libres, en particular de $O_2^{\cdot-}$, relacionada con el ejercicio en las especies de teleósteos incluidas en el presente estudio. Sin embargo, los datos obtenidos concuerdan con lo observado por López-Cruz *et al.* (2010) quienes encontraron una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en *I. oxyrinchus* y *Carcharhinus falciformis* (tiburón sedoso), elasmobranquios que son nadadores activos, en comparación con *Sphyrna zygaena* (tiburón martillo). Además, se ha sugerido que hay un aumento en el consumo y en el flujo de oxígeno bajo condiciones de ejercicio (Orhan *et al.*, 2004). En el elasmobranquio *Scyliorhinus stellaris* (alitán) se reportó un incremento en el consumo de oxígeno al pasar de un estado de reposo ($0.049 \pm 0.004 \text{ mmol min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) al ejercicio (nado) ($0.086 \pm 0.005 \text{ mmol min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) (Piiper, 1977).

En el presente estudio, se encontraron diferencias entre pares de especies con mayor actividad física (*I. oxyrinchus* y *K. audax*) y entre las de actividad física intermedia (*P. glauca* y *C. hippurus*). Los teleósteos (*K. audax* y *C. hippurus*)

presentaron mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ que sus contrapartes elasmobranquios. Ello puede estar relacionado con el tipo de sustrato que utilizan para la obtención de energía (Young et al., 2007; Maalouf et al., 2007; Paoli et al., 2014), como se mencionó anteriormente.

8.2 Sistema antioxidante enzimático

Se ha reportado que, tanto el ejercicio agudo como el ejercicio regular, pueden inducir la actividad de enzimas antioxidantes, como son superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) y GPx, sin cambios tan marcados en la actividad de CAT y superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu, Zn-SOD) (Ji 1995). Sin embargo, en el pez *Fundulus heteroclitus* (fúndulo) no se observaron diferencias en la actividad enzimática de CAT y SOD después de someterlo a ejercicio (Grim et al., 2010).

En el presente trabajo se encontró que, en general, la actividad de las enzimas antioxidantes fue mayor en el grupo de elasmobranquios que en los teleósteos. Se observan diferencias significativas entre grupos de peces (elasmobranquios y teleósteos) en la actividad de CAT, GPx y GST. Rudneva (1997) sugiere que los elasmobranquios, como grupo primitivo en comparación con los peces óseos, presentan un sistema antioxidante sustentado principalmente por elementos no enzimáticos. Las SOD son un grupo de metaloenzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 y funcionan como primer línea de defensa contra el estrés oxidativo (Finaud et al., 2006). Sin embargo, el H_2O_2 en presencia de metales de transición reducidos, como el Fe^{2+} (reacción de Fenton), puede a su vez ser convertido en radical hidroxilo ($\cdot OH$), que es una especie reactiva altamente dañina (Fernández et al., 2009).

En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en la actividad de SOD a nivel de grupo cuando se comparó la actividad entre elasmobranquios y teleósteos. Sin embargo, se observó una tendencia a que las especies de mayor actividad física, como *P. glauca* (elasmobranquio), *K. audax* y

C. hippurus (teleósteos), presenten mayor actividad de SOD, lo que coincide con lo reportado por Wilhelm-Filho y Boveris (1993) y Wilhelm-Filho *et al.* (1993) quienes encontraron mayor actividad de SOD y CAT en elasmobranquios y teleósteos más activas. Lo anterior concuerda con la mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en *K. audax* y *C. hippurus*.

Ansaldo *et al.* (2000) reportan en diferentes especies de peces óseos del Antártico promedios de la actividad de SOD ($U\ mg^{-1}$ proteína) para músculo de *Champscephalus gunnari* (draco rayado) (0.87), *Chaenocephalus aceratus* (draco antártico) (1.02), *Pseudochaenichthys georgianus* (draco cocodrilo) (0.78), *Dissostichus eleginoides* (austromerluza negra) (1.00) y *Notothenia rossii* (trama jaspeada) (0.70). Las 6 especies (elasmobranquios y teleósteos) incluidas en el presente estudio tienen mayor actividad de esta enzima, con el promedio más alto reportado para el tiburón *Prionace glauca* ($36.7\ U\ mg^{-1}$ proteína) y el más bajo para *Totoaba macdonaldi* ($16.8\ U\ mg^{-1}$ proteína).

La CAT se encarga de convertir el H_2O_2 en agua y oxígeno, dentro de la célula se encuentra en peroxisomas, citosol y mitocondria (Finaud, 2006; Fernández *et al.*, 2009). En el presente estudio, sólo en *K. audax* y *C. hippurus* (teleósteos más activos) la actividad de esta enzima se encontró por arriba del límite de detección en más del 50% de las muestras analizadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ansaldo *et al.* (2000), donde la CAT presenta la menor actividad en músculo de diferentes especies de peces. Una posible explicación para la actividad de CAT baja o indetectable en muchos de los organismos analizados de todas las especies de este estudio es el fenómeno conocido como acatalasemia (bajos o nulos niveles de CAT) que se menciona como una característica común en teleósteos marinos y de agua dulce (Marcon y Wilhem-Filho, 1999). Otra posible explicación es que las concentraciones de H_2O_2 no son lo suficientemente altas como para inducir la actividad antioxidante de esta enzima (Powers y Jackson, 2008).

La función principal de la GPx es remover el H_2O_2 (transformándolo en agua y oxígeno) de la célula, se encuentra en la mitocondria y en el citosol donde

protege a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del efecto de los radicales libres; a diferencia de la CAT la GPx tiene una mayor afinidad por el H₂O₂ (Urso y Clarkson, 2003). En el presente estudio, la mayor actividad de GPx se encontró en las especies más activas, *I. oxyrinchus*, *P. glauca* (elasmobranquios) y *K. audax* (teleósteo). Estos resultados sugieren que existe una producción de H₂O₂ menor a la necesaria para inducir la actividad de CAT, pero la suficiente para promover la actividad de GPx, principalmente entre los elasmobranquios. La actividad de la GPx puede variar en el músculo de peces y en algunos casos se eleva después del ejercicio (Ji 1995, 2008; Powers y Jackson 2008).

Las enzimas GR y GST quizá podrían ser consideradas como enzimas secundarias debido a la función que tienen; sin embargo, son importantes también dentro del sistema antioxidante enzimático, ya que de forma indirecta participan en la regulación de moléculas oxidantes (Hegazi *et al.*, 2010; Lushchak *et al.*, 2006; Rudneva *et al.*, 2010).

La GR se encarga de la regeneración del GSH a partir de GSSG (Halliwell y Gutteridge, 2007). En el presente estudio, no se observaron diferencias entre grupos (elasmobranquios vs. teleósteos) ni entre especies en la actividad de GR. Por ello, se sugiere que la concentración de GSH, su participación como antioxidante, tanto en forma libre como cofactor enzimático, y su tasa de reciclado es similar entre las especies de elasmobranquios (*I. oxyrinchus*, *P. glauca* y *M. henlei*) y de teleósteos (*K. audax*, *C. hippurus* y *T. macdonaldi*) estudiadas. En *C. hippurus*, se encontró una tendencia en la actividad de GR a ser menor en comparación con el resto de las especies analizadas (elasmobranquios y teleósteos), y significativamente diferente a su par con actividad física intermedia (*P. glauca*, elasmobranquio). Es posible que la concentración de GSH en el músculo de *C. hippurus* sea mayor y su tasa de reciclaje sea menor que en las otras especies de teleósteos y elasmobranquios estudiadas.

La enzima GST tiene una función principal de detoxificación de compuestos xenobióticos, catalizando la conjugación del GSH con metabolitos tóxicos o

contaminantes medioambientales (elementos traza, plaguicidas) (Egaas *et al.*, 1995; Rudneva *et al.*, 2010). También se le atribuyen otras funciones como marcador en el transporte de membrana y protección de diferentes tejidos contra el daño oxidativo (Blanchette *et al.*, 2007; Rudneva *et al.*, 2010). La actividad de GST puede utilizarse como indicador de la influencia de ambientes contaminados sobre las especies de estudio (Blanchette *et al.*, 2007). En el presente estudio, se observó una mayor actividad de GST en las especies más activas de ambos grupos, *I. oxyrinchus*, *P. glauca* (elasmobranquios) y *K. audax* (teleósteo). Se sugiere que, dada la gran capacidad de movimiento (alimentación, migración, hábitat) que tienen *I. oxyrinchus*, *P. glauca* y *K. audax*, es posible que frecuentemente estén expuestos a contaminantes en el ambiente.

El ejercicio aeróbico o anaeróbico puede producir un incremento en la actividad antioxidante enzimática en músculo, plasma, hígado y corazón, y se ha sugerido que, debido a la gran capacidad oxidativa del músculo, este tejido presenta una adaptación enzimática antioxidante específica (Clanton, 1999; Finaud *et al.*, 2006; López-Cruz *et al.*, 2010). En general, en el presente estudio, la mayor actividad antioxidante enzimática se encontró en las especies de elasmobranquios y de teleósteos con mayor actividad física (en cuanto a movilidad y velocidad de nado).

Se ha sugerido que un aumento en el sistema antioxidante enzimático podría ser innecesario si otro tipo de antioxidantes (por ejemplo, vitaminas) cumplen con esta función (Grim *et al.*, 2010; Leveelahti *et al.*, 2014). En el presente estudio, se observó que, en general, los peces óseos presentan menor actividad de las enzimas antioxidantes que los elasmobranquios. Es posible que algunas de las diferencias observadas en este estudio estén relacionadas con otro tipo de antioxidantes no enzimáticos, como el contenido de vitaminas que será analizado a continuación.

8.3 Sistema antioxidante no enzimático

Además del sistema de defensa antioxidante endógeno, el consumo de antioxidantes en la dieta ayuda a la protección contra diferentes procesos oxidativos (Bhadra *et al.*, 2004). Las vitaminas C y E funcionan como antioxidantes, previniendo los efectos de las ERO formadas durante y después del ejercicio (Evans, 2000). La vitamina E es un antioxidante obtenido exclusivamente por su ingesta en la dieta de vertebrados e invertebrados, mientras que la vitamina C puede ser sintetizada por algunas especies, incluyendo ciertos peces (Weber, 1995; Drouin *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que en los elasmobranquios el sistema antioxidante consiste en su mayoría de moléculas no enzimáticas, mientras que los teleósteos tienen mayor participación de las enzimas antioxidantes (Wilhelm-Filho y Boveris, 1993; Wilhelm-Filho *et al.*, 1993; López-Cruz *et al.*, 2010). En este estudio, se cuantificaron las concentraciones de vitaminas C y E en diferentes especies de teleósteos y elasmobranquios, incluyendo depredadores tope (tiburón mako, tiburón azul, marlín rayado y pez dorado) y consumidores secundarios (tiburón mamon y totoaba), para los que existe poca o nula información disponible relacionada con los sistemas antioxidantes, sobre todo con antioxidantes no enzimáticos.

La vitamina C típicamente se encuentra en altas concentraciones en diferentes tejidos endócrinos en comparación con el hígado, músculo, intestino y piel (Moreau y Dabrowski, 1996; Verlhac y Gabaudan, 1997). En teleósteos, como los salmónidos, las concentraciones más altas de vitamina C se encuentran en la parte anterior del riñón (Moreau y Dabrowski, 1996), y en especies como jurel, sardina, besugo y peces planos las concentración de vitamina C es mayor en hígado (Bhadra *et al.*, 2004) Este micronutriente se concentra principalmente en órganos vitales y se distribuye en ellos de acuerdo a su ingesta (Corredor y Landines, 2009; Verlhac y Gabaudan, 1997). La vitamina C se almacena en órganos con metabolismo alto, donde además pueden permanecer por largo

tiempo para usarse como reserva en caso de una falta de este micronutriente en el alimento (Dabrowsky, 2004; Gutiérrez-Salinas, 2007). Por ejemplo, la mayor parte de la vitamina C en peces se encuentra principalmente en el timo, leucocitos, cerebro, riñón, bazo e hígado (Verlhac y Gabaudan, 1997). Las concentraciones de esta vitamina en algunas especies de peces son más bajas en músculo comparadas con otros tejidos como el hígado ($43\text{-}78 \mu\text{g g}^{-1}$) (Bhadra *et al.*, 2004). Esto coincide con el supuesto de que el músculo de peces usualmente tiene bajas concentraciones de vitamina C incluso a niveles que pueden ser considerados como despreciables (Bragadóttir, 2001). Las concentraciones de esta vitamina en los elasmobranquios y teleósteos analizados en este estudio fueron de $0.012 \mu\text{g g}^{-1}$ y $0.007 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Se ha sugerido que, a diferencia de los peces óseos, los elasmobranquios son capaces de sintetizar vitamina C; sin embargo, los reportes incluyen únicamente algunas especies de rayas y tiburones de las familias Squalidae, Triakidae y Scyliorhinidae (Drouin *et al.*, 2011). La actividad de la enzima gulonolactona oxidasa (GLO) fue analizada bajo condiciones de saturación y se reportó en hígado de *Mustelus manazo* (musola) con una tasa de producción máxima de $14 \mu\text{g h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, y para *Squalus acanthias* (galludo) con una tasa máxima de producción de $513 \pm 224 \mu\text{g h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de tejido (Mæland y Waagbø, 1998). La especie *M. henlei* analizada en este estudio pertenece a la familia Triakidae, y el género *Mustelus* está dentro de los que quizá pueden sintetizar la vitamina C. Sin embargo, en el presente estudio, las concentraciones de vitamina C estuvieron por debajo del límite de detección en muestras de músculo de *M. henlei*. Son necesarios más estudios sobre esta vitamina y la actividad de GLO para determinar si la habilidad de producir y almacenar esta vitamina es comparable entre las especies del género *Mustelus* y la familia Triakidae.

Factores como la posición filogenética pueden ser más importantes que los hábitos alimenticios de los peces en su habilidad para sintetizar vitamina C (Corredor y Landines, 2009). La mayoría de los peces óseos no pueden sintetizar vitamina C; por lo tanto, se ha sugerido que la síntesis de esta vitamina es una

característica ancestral de los vertebrados que se perdió con el ancestro común de los peces óseos (Drouin *et al.*, 2011). Drouin *et al.* (2011) sugieren que la pérdida de capacidad para sintetizar vitamina C puede ser ventajosa dada la hipótesis de que en la síntesis de esta vitamina se favorece la formación de H₂O₂ y el agotamiento de GSH; sin embargo, esta hipótesis debe ser confirmada.

La concentración de la vitamina E varía de acuerdo a la actividad física del organismo en estudio (Evans, 2000; Satchek *et al.*, 2003; Gutiérrez-Salinas, 2007). Una baja concentración de vitamina E en animales que se ejercitan puede provocar un incremento en la susceptibilidad al daño provocado por ERO, lo que puede desencadenar agotamiento prematuro y una depresión en el control respiratorio mitocondrial en las células musculares (Kuang, 1991).

La vitamina E es requerida por el músculo y otros tejidos con el aumento de la actividad física; incluso hasta llegar a su agotamiento, como sucede en ratas sometidas a un ejercicio agudo submáximo (Meydani *et al.*, 1993). Otros antioxidantes, como el GSH, tienden a aumentar durante el entrenamiento (Evans, 2000).

La concentración de vitamina E encontrada en elasmobranquios y teleósteos en el presente estudio se encuentra en un rango de 0.011 a 0.038 µg g⁻¹. Se han reportado pocos datos sobre la concentración de vitamina E en peces silvestres sin influencia del aporte en la dieta. Las concentraciones de vitamina E reportadas para *Sardina pilchardus* (sardina) (0.016 µg g⁻¹), *Engraulis encrasicolus* (0.0002 µg g⁻¹), *Salmo salar* (salmón) (0.02 µg g⁻¹), *Merluccius merluccius* (merluza) (0.0035 µg g⁻¹), *Solea vulgaris* (lenguado) (0.01 µg g⁻¹) y *Pagellus bogaraveo* (besugo) (0.015 µg g⁻¹) (Falder-Rivero, 2006) son similares a las encontradas en las especies del presente estudio, a excepción de *C. hippurus* (0.002-0.424 µg g⁻¹) y *K. audax* (0.008-0.508 µg g⁻¹) en las cuales los valores de las concentraciones máximas de vitamina E fueron mayores. Las concentraciones de vitamina E en músculo del pez dorado y del marlín rayado encontradas en este estudio son menores que lo reportado en hígado de *Scophthalmus maximus* (rodaballo) (160 µg g⁻¹), *Hippoglossus hippoglossus* (hipogloso) (71 µg g⁻¹) y *Sparus aurata*

(dorada) ($54 \mu\text{g g}^{-1}$) (Tocher *et al.*, 2002), y son menores que las reportadas en plasma de *Parapercis colias* (bacalao azul) ($14 \mu\text{M}$) y *Notolabrus fucicola* (pez loro) ($18.9 \mu\text{M}$) (Giese *et al.*, 2000).

El contenido de vitamina E en tejidos como hígado, músculo y sangre de diferentes especies de peces es influenciado por su consumo en la dieta y, en menor medida, por la ingesta de lípidos (Stephan *et al.*, 1995). En la mayoría de los peces, el hígado es el principal sitio de almacenamiento de la vitamina E cuando hay abundancia de este nutriente en la dieta (Tocher *et al.*, 2002).

Los niveles de vitamina E están relacionados con los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los peces, quizá como un mecanismo de protección contra la peroxidación de estas moléculas altamente susceptibles al daño oxidativo (Stephan *et al.*, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2007). La concentración de vitamina E también está relacionada con el ambiente en el que habitan las diferentes especies de peces, como se ha observado en dos especies del antártico que presentan concentraciones de hasta seis veces más que las especies de zonas templadas (Wilhelm-Filho, 2007). Además, se ha encontrado en los peces antárticos un componente poco común de la vitamina E (α -tocomonoenol), por lo que es posible que la concentración de las diferentes formas de vitamina E sea diferente entre especies (Wilhelm-Filho, 2007).

La combinación de las vitaminas C y E en peces contribuye a mejorar el crecimiento, la respuesta inmune, el metabolismo de nutrientes y la resistencia al estrés; la vitamina C participa en el proceso de absorción de la vitamina E y en el metabolismo de lípidos (Corredor y Landines, 2009). La concentración de vitamina E incrementa en el músculo, hígado, corazón y riñón de *S. maximus* bajo dietas altas en α -tocoferol, mientras que el efecto en la concentración del ascorbato en músculo es el contrario (Ruff *et al.*, 2003). Después del ejercicio, ambas vitaminas C y E pueden aumentar en plasma, sugiriendo que los requerimientos y movilización de estos antioxidantes pueden incrementar con el ejercicio, evitando de esta manera el daño oxidativo e incluso la fatiga muscular, como se ha observado en roedores (Kuang, 1991; Meydani *et al.*, 1993).

Es posible que la principal diferencia en la capacidad antioxidante entre teleósteos y elasmobranquios, y quizá incluso en mamíferos, esté relacionada con el tipo específico de compuestos antioxidantes y los niveles encontrados en sus tejidos. En los tejidos de elasmobranquios las propiedades antioxidantes de los derivados de la urea (hidroxiurea, dimetilurea, tiourea), así como los niveles específicos de GSH y las vitaminas C y E pueden contribuir en su tolerancia a mayores niveles de lipoperoxidación en comparación con otros vertebrados (Wilhelm-Filho *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999; López-Cruz *et al.*, 2010).

8.4 Capacidad antioxidante total

Este indicador nos da un valor total que corresponde a la suma de todos los antioxidantes; un incremento en la capacidad antioxidante puede ser debido a los efectos del estado nutricional o debido a una adaptación al estrés oxidativo (Finaud, 2006). La mayoría de los indicadores del sistema antioxidante enzimático y no enzimático evaluados en el presente estudio fueron mayores para el grupo de elasmobranquios que en teleósteos. Sin embargo, la capacidad antioxidante total, evaluada por medio de la reducción de un radical libre comercial (DPPH[•]), fue mayor para el grupo de teleósteos. Esto posiblemente se debe a la participación de otros antioxidantes que no se evaluaron en este estudio.

Las especies de mayor actividad física dentro de cada grupo, elasmobranquios y teleósteos, presentaron la mayor capacidad antioxidante (*I. oxyrinchus* y *K. audax*). Esto parece estar relacionado con la alta producción de radicales libres observada, sobre todo en el grupo de peces óseos. El papel de los antioxidantes en especies acuáticas es de gran importancia debido a los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados presentes en muchos peces. Compuestos con función antioxidante, como el GSH y los carotenoides, han sido detectados en tejidos de peces como *Colossoma macropomum* (cachama), *Sardina pilchardus* (sardina europea), *Merluccius merluccius* (merluza), *Serranus cabrilla* (cabrilla), *Scomber scombrus* (caballa), *Thunnus alalunga* (atún blanco),

Squalus acanthias (galludo) (Marcon y Wilhelm-Filho, 1999; Passi *et al.*, 2002; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

El glutatión es un tripéptido que participa en las reacciones del metabolismo de aminoácidos como donante de grupos gamma glutamilos (Konigsberg, 2008). El glutatión reducido (GSH) es capaz de ceder electrones desde su grupo sulfidrilo (-SH) a una especie oxidada, como un lipoperóxido, teniendo así una acción antioxidante y dando como producto GSSG (Benítez-Zequeira, 2006; Konigsberg, 2008). El GSH es un antioxidante de bajo peso molecular que interviene en diversas funciones celulares, entre ellas la neutralización de ERO, está presente en las células en concentraciones milimolares, alrededor de 10 mM (Lushchak, 2006). En órganos del pez *Carassius auratus* (japonés dorado) se han detectado altos niveles de GSH, con un contenido máximo de 2.88 mM en hígado y al someterlos a 8 horas de anoxia solamente disminuyen ligeramente en el riñón (Lushchak *et al.*, 2001).

En *Cyprinus carpio* (carpa) se han observado concentraciones de GSH varios órdenes de magnitud menores, lo que se ha demostrado con su menor tolerancia a la disminución de oxígeno (Lushchak *et al.*, 2005). Aparentemente la hipoxia no tiene efecto sobre el nivel de GSH en estas especies, pero la reoxigenación lo incrementa al doble en el hígado (Lushchak *et al.*, 2005). El estado del glutatión (GSH, GSSG) es críticamente importante para la resistencia al estrés oxidativo en peces; bajo condiciones de estrés aumenta la síntesis de GSH *de novo* en *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) y *Mugil cephalus* (salmonete rayado) (Winston y Di Giulio, 1991; Lushchak *et al.*, 2006).

8.5 Daño oxidativo

Las ERO pueden afectar todas las macromoléculas celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ADN (Aguiló, 2005; Lushchak, 2006; Nakamoto *et al.*, 2007). Si hay un evento de estrés oxidativo, uno de los principales indicadores de que la defensa antioxidante ha sido inadecuada o insuficiente es una elevación en la peroxidación

de lípidos (Renshaw *et al.*, 2012). Es un proceso de autopropagación en el que se forma un radical peroxilo cuando una ERO es lo suficientemente reactiva para abstraer un átomo de hidrógeno de un lípido intacto (Halliwell y Gutteridge, 2007). La peroxidación lipídica trae consigo consecuencias negativas importantes en los organismos, que consisten principalmente en el daño directo a la estructura de la membrana celular, e indirectamente a otros componentes celulares por la producción de aldehídos reactivos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004); este indicador de daño oxidativo se evalúa clásicamente por medio de la medición de productos primarios como dienos conjugados (fase inicial), peróxidos de lípidos y productos finales de la peroxidación lipídica como malondialdehído (MDA) que es un indicador de la degradación oxidativa de la membrana celular (Halliwell y Gutteridge, 2007; Finaud, 2006). Las membranas peroxidadas llegan a ser rígidas y cambian su permeabilidad e integridad (Lushchak, 2006).

Se encontró mayor daño a lípidos (TBARS) en el grupo de elasmobranquios (1.76 nmol mg⁻¹ de proteína) en comparación con los teleósteos (0.74 nmol mg⁻¹ de proteína); esto coincide con lo observado por Wilhelm-Filho y Boveris (1993) quienes reportan mayor daño oxidativo a lípidos (TBARS μmol g⁻¹ tejido) en músculo de *Squatina argentina* (angelito, 0.4 μmol g⁻¹ tejido), *Sphyrna lewini* (tiburón martillo, 0.1 μmol g⁻¹ tejido), *Myliobatis goodei* (raya águila, 0.3 μmol g⁻¹ tejido), *Raja castelnaui* (raya de lunares, 0.3 μmol g⁻¹ tejido), *Psammobatis scobina* (raya de arena, 0.5 μmol g⁻¹ tejido) y *Raja agassizi* (raya lisa, 0.3 μmol g⁻¹ tejido) en comparación con los niveles de TBARS observados en músculo de teleósteos; *Oreochromis niloticus* (tilapia del Nilo, 10 nmol g⁻¹ tejido), *Acipenser naccarii* (esturión, ~20 nmol g⁻¹ tejido), *Cyprinus carpio* (2.96 nmol g⁻¹ tejido), *Ameiurus melas* (bagre, 29.14 nmol g⁻¹ tejido) y *Oncorhynchus mykiss* (29.27 nmol g⁻¹ tejido) (Otto y Moon, 1996; Trenzado *et al.*, 2006; Hegazi *et al.*, 2010). Estos valores reportados para teleósteos son menores a lo encontrado en músculo de teleósteos de este estudio (*K. audax* = 1.93 nmol mg⁻¹ de proteína, *C. hippurus* = 0.73 nmol mg⁻¹ de proteína, *T. macdonaldi* = 0.54 nmol mg⁻¹ de proteína).

La mayor peroxidación lipídica y la mayor actividad de GPx observadas en el grupo de elasmobranquios en el presente estudio, pueden sugerir una estimulación de la actividad de esta enzima. Se reporta una correlación positiva en la actividad de GPx y el daño oxidativo a lípidos (expresado en nmol g^{-1} de MDA), con una disminución de la actividad de las enzimas SOD, CAT, GPx y el daño a lípidos en músculo rojo de anguilas entrenadas (Mortelette *et al.* 2010), así como una correlación positiva entre la actividad de GPx y la peroxidación de lípidos (expresada en nmol g^{-1} de TBARS) en diferentes tejidos (entre ellos, músculo blanco) de trucha y esturión (Trenzado *et al.* 2006). Así mismo, se ha sugerido que el ejercicio vigoroso puede producir daño en tejidos, seguido por una respuesta inflamatoria, lo que generalmente coincide con un incremento en la actividad de GPx (Ji, 1999). De la misma forma, la GPx participa en el metabolismo de peróxidos lipídicos, por lo que su aumento sugiere una posible prevención para disminuir el daño oxidativo (Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002; Lushchak *et al.*, 2001; Lushchak *et al.*, 2005). Es posible que, en algunos casos, este incremento de la actividad enzimática sea insuficiente, lo que quizá está relacionado con el alto contenido de PUFA (Trenzado *et al.*, 2006). En el presente estudio, se observó mayor actividad de GPx en las especies de mayor actividad física, *I. oxyrinchus*, *P. glauca* (elasmobranquios) y *K. audax* (teleósteo).

Los valores reportados de daño oxidativo a lípidos (TBARS) por López-Cruz *et al.* (2010) en músculo de *C. falciformis*, *I. oxyrinchus* y *S. zygaena* (cornuda prieta) (con 5.62, 3.67 y 5.93 $\text{nmol TBARS mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente) son similares a los encontrados en este estudio para músculo de elasmobranquios (*I. oxyrinchus* = 1.43 nmol mg^{-1} de proteína, *P. glauca* = 2.41 nmol mg^{-1} de proteína, *M. henlei* = 0.91 nmol mg^{-1} de proteína). En las especies de mayor actividad física en ambos grupos de peces se observaron los niveles más altos de TBARS, principalmente en *P. glauca* (elasmobranquio) y en *K. audax* (teleósteo). Entre pares de especies con actividad de nado similar se encontró mayor daño oxidativo a lípidos en *P. glauca* que en *C. hippurus*.

Las especies incluidas en el presente estudio habitan en rangos de temperatura similares, con preferencia por aguas frías y templadas, *I. oxyrinchus* (17°C) (Kohler *et al.*, 2002; Velasco-Tarelo, 2005), *P. glauca* (20-22°C) (Hernández-Aguilar, 2008), *M. henlei* (18°C) (Silva-Santos, 2012), *K. audax* (22-24°C) (Sevilla-Rodríguez, 2013), *C. hippurus* (20°C) (Tripp-Valdez, 2005) y *T. macdonaldi* (17°C) (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Por lo tanto, es posible que el daño a lípidos no esté relacionado con la temperatura ambiental.

Se analizó el efecto en los niveles de peroxidación de lípidos (nmol MDA min⁻¹ mg⁻¹ de fosfolípidos) en *Fundulus heteroclitus* y *Lepomis macrochirus* (mojarra oreja azul) no cambian en respuesta a aclimatación a temperaturas de 5°C y 25°C, a pesar de la remodelación de lípidos que existe a bajas temperaturas presentando elevadas cantidades de PUFA (Grim *et al.*, 2010) (Wodtke, 1978; Crockett and Hazel, 1995; Logue *et al.*, 2000).

El riesgo a la peroxidación de lípidos puede magnificarse debido a que los peces que se desarrollan a bajas temperaturas generalmente poseen mayores capacidades oxidativas (Guderley, 2004) y presentan un aumento significativo de mitocondrias (Johnston y Maitland, 1980; Egginton y Sidell, 1989). Ello puede generar un mayor consumo de oxígeno resultando en elevadas concentraciones de ERO, sobre todo al tener una mayor actividad física, como se ha mencionado anteriormente.

El daño oxidativo a lípidos en músculo, en general para cualquier grupo de peces o especies, es menor que lo reportado para otros tejidos, como el riñón (*Cyprinus carpio*: 42.7 nmol TBARS g⁻¹ tejido; *Squatina argentina*: 1.3 μmol g⁻¹ tejido), hígado (*Oreochromis niloticus*: 59 nmol TBARS g⁻¹ tejido; *Sphyrna lewini*: 4.2; *Raja agassizi*: 3.8 μmol TBARS g⁻¹ tejido) y tracto digestivo (*Oncorhynchus mykiss*: ~480; *Acipenser naccarii*: ~380 nmol TBARS g⁻¹ tejido) (Wilhelm-Filho y Boveris, 1993; Lushchak *et al.*, 2005; Trenzado *et al.*, 2006; Hegazi *et al.*, 2010). Se ha sugerido que en vertebrados, el hígado presenta un alto metabolismo y mayor consumo de oxígeno (Trenzado *et al.*, 2006), quizá por esta razón presenta valores más altos de daño oxidativo a lípidos.

Las elevadas concentraciones de TBARS que se observan en hígado de elasmobranquios pueden estar relacionadas con el alto contenido de escualeno (Wilhelm-Filho y Boveris 1993). Éste es un hidrocarburo poliinsaturado de baja densidad que ayuda en la flotabilidad de elasmobranquios; aunque en aceite de hígado de *I. oxyrinchus* se ha reportado que su contenido es menor al 1% (Heller *et al.*, 1957).

El efecto de las ERO sobre proteínas puede provocar ruptura en enlaces peptídicos, modificaciones en aminoácidos, oxidación de carbohidratos, oxidación de grupos sulfidrilo y formación de carbonilos proteicos (Stadtman, 1993; Almroth *et al.*, 2005). El daño oxidativo a proteínas no es reversible y ocasiona cambios conformacionales que llevan a la inactivación de enzimas disminuyendo su actividad catalítica provocando perturbaciones en el metabolismo (Szweda y Stadtman, 1992; Stadtman, 1993; Cabisco y Levine, 1995), y resultando en una degradación de la proteína dañada por proteasas (Almroth *et al.*, 2005). El incremento en los grupos carbonilo se presenta con cada fenómeno relacionado al estrés oxidativo (Shacter *et al.*, 1994, Almroth *et al.*, 2005). Por ello, es el método más usado para la determinación de daño a proteínas por radicales libres.

En el presente estudio no se encontraron diferencias en el daño oxidativo a proteínas (carbonilos proteicos) entre ambos grupos de peces (elasmobranquios = $45.79 \mu\text{m g}^{-1}$ de tejido, y teleósteos = $40.47 \mu\text{m g}^{-1}$ de tejido). Sin embargo, el contenido de carbonilos proteicos es alto (hasta tres veces más en elasmobranquios) en las especies más activas marcando diferencias entre las especies dentro de cada uno de nuestros grupos de estudio, principalmente en *I. oxyrinchus* ($71.86 \mu\text{m g}^{-1}$ de tejido, elasmobranquio, actividad física alta) y *C. hippurus* ($54.66 \mu\text{m g}^{-1}$ de tejido, teleósteo, actividad física media). Debido a que la vida media de un grupo carbonilo es larga, una elevada cantidad de carbonilos pueden indicar efectos acumulativos del estrés oxidativo (Finaud, *et al.*, 2006). Quizá es este efecto acumulativo lo que se puede observar en general para los organismos de mayor actividad física de este estudio.

Después de hacer una revisión exhaustiva en bases de datos como Pubmed, se determinó que hasta la fecha no se han reportado datos puntuales sobre daño oxidativo a proteínas relacionado con ejercicio en elasmobranquios. Se han reportado niveles de carbonilos proteicos (nmol g^{-1} de tejido) en diferentes tejidos de peces óseos; en músculo (135 nmol g^{-1} de tejido) e hígado (211 nmol g^{-1} de tejido) de *Oreochromis niloticus* (Hegazi *et al.*, 2010); y en músculo (150 nmol g^{-1} de tejido), hígado (300 nmol g^{-1} de tejido), cerebro (325 nmol g^{-1} de tejido) y riñón (540 nmol g^{-1} de tejido) de *Cyprinus carpio* (Lushchak *et al.*, 2005) (especies dulceacuícolas).

Los tejidos aeróbicos como el cerebro, riñón y el hígado poseen un alto potencial para la generación de ERO, por lo que presentan altas concentraciones de carbonilos proteicos en comparación al músculo (Lushchak y Bagnyukova, 2006). Aun así, los valores reportados para el músculo de las especies del presente estudio son mayores a lo reportado por otros autores. La exposición a hiperoxia resulta en un incremento de carbonilos proteicos en tejidos de *Carassius auratus*, permaneciendo altos durante la recuperación en condiciones normoxicas (Lushchak *et al.*, 2005). Posiblemente, las diferencias radican en la concentración de oxígeno disponible en agua marina en comparación con el agua dulce, ambiente donde viven las especies de este estudio.

Cuando existen concentraciones moderadas de moléculas oxidantes, la degradación de las proteínas dañadas incrementa, mientras que altas concentraciones de oxidantes pueden inhibir la degradación proteolítica (Grune *et al.*, 2003). Las proteínas severamente oxidadas forman agregaciones que disminuyen su solubilidad (Grune *et al.*, 2003). Muchos productos oxidados como peróxidos, aldehídos y carbonilos forman aductos con las proteínas, lo que contribuye a la formación de grandes agregados que no pueden ser degradados por proteólisis (Grune, 2000; Grune *et al.*, 2003). Por ende, hay una acumulación de moléculas dañadas (Almroth *et al.*, 2005).

En el caso particular de *P. glauca* (elasmobranquio de actividad física media), especie en la que generalmente se pudo observar mayor actividad

antioxidante enzimática y mayores concentraciones de antioxidantes no enzimáticos, no se observó evidencia de acumulación de proteínas dañadas cuando la comparamos con las otras dos especies del mismo grupo (*I. oxyrinchus* y *M. henlei*). Se ha sugerido que un incremento en la peroxidación lipídica puede prevenir o retrasar la formación de carbonilos proteicos (Grune, 2000). En músculo de *P. glauca* se encontraron los valores más altos de lípidos peroxidados entre los elasmobranchios incluidos en el presente estudio.

El músculo esquelético es el tejido de mayor masa en el cuerpo y está conformado por células postmitóticas, las cuales son más propensas a la acumulación del daño oxidativo (Radák *et al.*, 2001b). Como se mencionó anteriormente, el ejercicio puede llevar a una condición de estrés oxidativo debido al incremento en el consumo de oxígeno que puede resultar en una elevada generación de ERO (Marini y Veicsteinas, 2010; Goto y Radak, 2013). Esta sobreproducción de ERO puede ocurrir en las mitocondrias y en sistemas enzimáticos, como en las reacciones catalizadas por la xantina oxidasa en el metabolismo de purinas, y por la NADPH deshidrogenasa en procesos inflamatorios (Marini y Veicsteinas, 2010; Goto y Radak, 2013). Además, durante el ejercicio puede haber un aumento en el consumo de ATP y daño oxidativo en el músculo cuando se realiza un ejercicio no acostumbrado (Goto y Radak, 2013). El ejercicio exhaustivo incrementa la oxidación de proteínas en músculo esquelético de animales sedentarios o de baja actividad que no están preparados para un aumento de estrés por oxidación (Goto y Radak, 2013).

Las ERO inducen diversos tipos de daño al ADN, como rupturas de cadena, entrecruzamiento de ADN con proteínas y modificación de las bases (Finaud *et al.*, 2006). Las ERO, en especial el $\cdot\text{OH}$ reacciona con los nucleótidos ocasionando mutaciones en la estructura de azúcar-fosfato que conduce a mutaciones puntuales (Lushchak y Bagnyukova, 2006). Se han descrito una gran variedad de productos del daño oxidativo al ADN, pero el 8-OHdG producido por la oxidación de guanina por radicales libres, ha sido ampliamente usado como indicador de estrés oxidativo y marcador de genotoxicidad en los organismos (Finaud *et al.*,

2006; Lushchak y Bagnyukova, 2006). La oxidación del ADN es reparada continuamente y los nucleótidos oxidados, como el 8-OHdG, son excretados en la orina (Finaud *et al.*, 2006; Nakamoto, 2007).

En el presente estudio, se observó mayor daño oxidativo al ADN (8-OHdG ng mL⁻¹) en el grupo de teleósteos (63.67 ng mL⁻¹) en comparación con elasmobranquios (43.06 ng mL⁻¹). Esto puede estar relacionado con la mayor producción de O₂⁻ en teleósteos y, en general, con la reducida defensa antioxidante evaluada (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) observada en las especies de este grupo. El ejercicio induce a la adaptación del músculo y esto resulta en una disminución en el daño oxidativo al ADN y proteínas (Radák *et al.*, 2002). Los niveles de 8-OHdG disminuyen con la práctica de ejercicio regular en leucocitos de humanos (Asami *et al.*, 1998) y músculo esquelético de ratas (Radák *et al.*, 1999). El ejercicio (nado) regular puede disminuir el daño oxidativo a proteínas y ADN en músculo esquelético (Radák *et al.*, 1999) y cerebro (Radák *et al.*, 2001a) de ratas. Un nivel moderado (sin ser exhaustivo) de ejercicio regular (habitual) puede considerarse una forma de hormesis, mientras que un ejercicio excesivo en un organismo no entrenado (que no lo realiza habitualmente), ocasiona una producción masiva de ERO que excede la capacidad antioxidante de las células (Ogonovszky *et al.* 2005). El ejercicio moderado puede ser benéfico, induciendo una respuesta adaptativa que permite hacer frente al estrés oxidativo (Radák *et al.*, 1999; Radák *et al.*, 2001b; Ogonovszky *et al.*, 2005). El ejercicio regular incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes en músculo (Powers *et al.*, 1999; Ji, 2002) e hígado de ratas (Kakarla *et al.*, 2005). Por todo lo anterior, se podría proponer que los peces óseos tienen una menor adaptación al ejercicio en comparación con elasmobranquios.

Dentro de cada grupo de peces (elasmobranquios vs. teleósteos) encontramos diferencias entre especies en el daño oxidativo al ADN (8-OHdG), de acuerdo a la actividad física. La práctica de ejercicio (entrenamiento) incrementa la protección contra el estrés oxidativo y modula la actividad de las enzimas de reparación del ADN en músculo esquelético (Radák *et al.*, 2002; Radák *et al.*,

2003; Radák *et al.*, 2008). Esto quizá está relacionado con los niveles bajos de daño oxidativo al ADN observados para las especies de mayor actividad física en el presente estudio. En *T. macdonaldi* (teleósteo de baja actividad física), los niveles de daño oxidativo al ADN, a lípidos y proteínas fueron menores en comparación a las otras especies de teleósteos analizadas. Los organismos de *T. macdonaldi* incluidos en el presente estudio son pre-adultos y de hábitos bentónicos con condiciones medio ambientales (temperatura, salinidad, contaminantes) relativamente poco variables (en comparación con las de la parte más alta del golfo de California, donde se encuentran los adultos de la especie) (De Anda-Montañez *et al.*, 2013). Es posible que estos organismos se mantengan en un balance entre la generación de ERO, el sistema antioxidante y el daño oxidativo.

8.6 Análisis entre grupos, especies y por actividad de nado

Para determinar si existen diferencias en la respuesta fisiológica de los indicadores de estrés oxidativo (producción de ERO, sistema antioxidante, daño oxidativo) entre grupos, se realizó un análisis discriminante. Los resultados sugieren una separación entre elasmobranquios (tiburones) y teleósteos (peces óseos). Esta herramienta numérica permitió identificar cuáles son los indicadores de estrés oxidativo que contribuyen de manera más importante a explicar las diferencias en la respuesta fisiológica entre elasmobranquios y teleósteos. Con las dos primeras raíces se logró explicar un 79% de la variabilidad en los datos, siendo la capacidad antioxidante total (raíz 1), las variables de daño oxidativo (peroxidación de lípidos, carbonilos proteicos y daño al ADN) y vitamina E (raíz 2) las variables que más contribuyeron a la varianza explicada. Además, de las 11 variables evaluadas en este análisis, 10 resultaron ser significativas, pero sólo 5 contribuyeron de manera significativa en la separación de los grupos (elasmobranquios, teleósteos). Por lo que podemos concluir que los indicadores

analizados resultan adecuados para futuros estudios en cuanto a la respuesta fisiológica en la actividad física en peces.

Para determinar si existen diferencias en los indicadores de estrés oxidativo (producción de ERO, sistema antioxidante, daño oxidativo) entre las tres especies de elasmobranquios, dada la biología de cada una, se realizó un análisis discriminante y se encontró que las tres especies de elasmobranquios se separan claramente. Las variables que contribuyeron mayoritariamente para explicar las diferencias entre las tres especies fueron los indicadores del daño oxidativo a proteínas (carbonilos proteicos) y a lípidos (TBARS), (raíz 1, varianza explicada 79%); así como la capacidad antioxidante total y la concentración de vitamina E (raíz 2, varianza explicada 100%).

Dentro del grupo de teleósteos también se observó una separación entre las especies; sin embargo, las variables que marcan esta separación son diferentes respecto a elasmobranquios. En el análisis discriminante se encontró que la raíz 1 explica el 57% de la variabilidad de los datos, y las variables que contribuyen con la mayor varianza son la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la actividad enzimática de la SOD; mientras que con la raíz 2 se explica el 100% de la variabilidad de los datos, con la actividad de GST y el daño al ADN como las variables que contribuyen más a la varianza explicada.

Finalmente, para determinar si existen diferencias en los indicadores de estrés oxidativo (producción de ERO, sistema antioxidante, daño oxidativo) relacionadas con la actividad física de las diferentes especies de estudio, se realizó un análisis discriminante. Los resultados sugieren que hay separación entre los tres pares de especies (actividad alta, intermedia, baja) con base en la capacidad antioxidante total y el daño oxidativo a proteínas y al ADN (raíz 1, varianza explicada 87%), así como la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la actividad de la enzima GPx (raíz 2, varianza explicada 100%).

9. CONCLUSIONES

Es posible identificar diferencias relacionadas con la actividad física entre ambos grupos de peces (elasmobranquios y teleósteos) en los indicadores de estrés oxidativo (producción de ERO, defensas antioxidantes y daño oxidativo) analizados en este estudio.

En general, el grupo de elasmobranquios presenta mayor actividad enzimática antioxidante y mayor concentración de antioxidantes no enzimáticos. Con lo anterior, podemos sugerir que, además del nivel evolutivo, hay otros factores (como hábitos alimenticios, biogeografía, edad de los organismos muestreados) que contribuyen a las diferencias en las defensas antioxidantes entre los dos grupos de peces.

Se encontró una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ (en teleósteos) y una mayor capacidad antioxidante (elasmobranquios y teleósteos) en aquellas especies que tienen la capacidad de desarrollar una actividad física alta e intermedia, como son *I. oxyrinchus*, *P. glauca* (elasmobranquios) y *K. audax*, *C. hippurus* (teleósteos). Ello puede estar relacionado con diferencias en la tasa metabólica basal y/o densidad mitocondrial entre especies con diferentes grados de actividad física.

Se observaron diferencias en el daño oxidativo a nivel de lípidos, proteínas y ADN entre las especies de estudio de cada grupo de peces. Lo anterior sugiere que, además de la actividad física, hay otros factores (como hábitos alimenticios, biogeografía, edad de los organismos muestreados) que contribuyen a las diferencias en el daño oxidativo entre las especies de cada grupo de peces (elasmobranquios, teleósteos).

La capacidad antioxidante total es mayor en teleósteos, lo cual posiblemente esté relacionado con la mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ observada en este grupo. Es posible que, dentro de esta capacidad antioxidante total, estén participando otros antioxidantes enzimáticos y/o no enzimáticos que no fueron evaluados en este estudio, como carotenoides. Sin embargo, es necesario hacer una evaluación más

detallada sobre la posible participación de otros antioxidantes, lo que abre la posibilidad a futuras investigaciones.

10. LITERATURA CITADA

- Abitía-Cárdenas, L. A., Muhlia-Melo, A., Cruz-Escalona, V., Galván-Magaña, F. 2002. Trophic dynamics and seasonal energetics of striped marlín *Tetrapturus audax* in the southern Gulf of California, México. Fisheries research. 57: 287-295.
- Abitia-Cárdenas, L. A., Arizmendi-Rodríguez, D. I., Cruz-Escalona, V. H., Manjarrez-Acosta, C. 2012. Feeding of striped marlín, *Kajikia audax* (Philippi 1987), from the área off the coast of Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Research Journal of Fisheries and Hydrobiology. 7(1): 6-13.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. En: Packer, L. (Ed.). Methods in enzymology, Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Inc. E.U.A. 105: 121-126.
- Agilent Technologies Company. HPLC for Food Analysis. 2001. Publication Number 5988-3294EN.
- Aguilar-Palomino, B. 1993. Espectro trófico del dorado *Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758 (Osteichthyes: Coryphaenidae), capturado en la bahía de La Paz y Cabo San Lucas, Baja California Sur, México, durante 1990 y 1991. CICIMAR. Tesis maestría. 101 p.
- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, Tur, J. A., Córdova, A., Pons, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. Physiology and Behavior. 84: 1-7.
- Alava, V., Kanazawa, A., Teshima, S., Koshio, S. 1993. Effects of dietary vitamins A, E, and C on the ovarian development of *Panaeus japonicus*. Nippon Susian Gakkaishi. 59(7): 1235-1241.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, Å., Förlin, L. 2005. Oxidative Damage in Eelpout (*Zoarces viviparus*), Measured as Protein Carbonyls and TBARS, as Biomarkers. Aquatic Toxicology, Vol.73, pp. 171–180, ISSN 0166-445X
- Altringham, J. D., Ellerby, D.J. 1990. Fish swimming: Patterns in muscle function. J. Exp. Biol. 202: 3397-3403.

- Álvarez-Borrego, S., Lara-Lara, J. R. 1991. The physical environment and productivity of the Gulf of California. In: Dauphin, J.P. y Simoneit, B. (Eds.). The Gulf and Peninsular Province of the Californias. Amer. Assoc. Petrol. Geol. Mem. 47: 555-567.
- Ansaldo, M., Luquet, C. M., Evelson, P. A., Polo, J. M., Llesuy, S. 2000. Antioxidant levels from different antarctic fish caught around south Georgia island and shag rocks. Polar Biol. 23: 160-165.
- Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H. 1998. Reduction of 8-hydroxyguanine in human leukocyte DNA by physical exercise. Free Radic Res 29: 581-584.
- Bhadra, A., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. 2004. Radical-scavenging activity: Role of antioxidative vitamins in some fish species. Food. Sci. Technol. Res. 10(3): 264-267.
- Ballantyne, J. S. 1997. Jaws: the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. Comp. Biochem. Physiol Part B. 118: 703-742.
- Beamish, F. W. H., 1978. Swimming capacity. In: Hoar, S., Randall, D. J. (Eds.), Fish Physiology, vol. VII. Academic Press, Inc, New , New York, pp.101-138.
- Benítez-Zequeira, D. E. 2006. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo.
- Blanchette, B., Feng, X., Singh, B. R. 2007. Marine Glutathione S-Transferases. Marine Biotechnology. 9: 513-542.
- Boddeke, R., Slijper, E. J., Stelt, A., Der, V. 1959. Histological characteristics of the body musculature of fishes in connection with their mode of life. Proc. K. Tied. Akad. Wet. Ser. C 6a: 576-88.
- Bone, Q. 1964. Patterns of muscular innervation in the lower chordates. Int. Rev. Neurobiol. 6: 99-147.
- Bone, Q. 1966. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in Elasmobranch fish. J. mar. biol. Ass. TJJ. 46: 321-50.

- Bone, Q. 1970. Muscular innervation and fish classification. *Simp. Int. Zoofil.* 1st. Univ. Salamanca, pp. 369-377.
- Bone, Q., Chubb, A. D. 1978. The histochemical demonstration of myofibrillar ATPase in elasmobranch muscle. *Histochem. J.* 10: 489-494.
- 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: 248-54.
- Bragadóttir, M. 2001. Endogenous antioxidants in fish. Master of science thesis. University of Iceland. 59 pp.
- Brett, J. R. 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Res. Board Canada.* 21: 1183-1226.
- Cabiscol, E., Levine, R.L., 1995. Carbonic anhydrase: III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *J. Biol. Chem.* 270, 14742-14747.
- Cailliet, G. M., Goldman, K. J. 2004. Age determination and validation in chondrichthyan fishes. pp. 399-448 in Carrier, J. C., Musick, J. A. and Heithaus, M. R. (Eds.). *Biology of the sharks and their relatives.* CRC Press. Boca Raton.
- Carlson, J.K., Palmer, C.L., Parsons, G.R., 1999. Oxygen consumption rate and swimming efficiency of the blacknose shark, *Carcharhinus acronotus*. *Copeia* 1: 34-39.
- Carvajal, M., Remedios-Martínez, M., Martínez-Sánchez, F., Alcaraz, C. 1997. Effect of Ascorbic Acid Addition to peppers on paprika quality. *J. Sci. Food Agric.* 75: 442-446.
- Cisneros-Mata, M., Montemayor-López, G., Román-Rodríguez, M. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology.* 9(4): 806-814.

- Cisneros-Mata, M. A., Botsford, L. W., Quinn, J. F. 1997. Projecting viability of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecological Applications*. 7 (3): 968-980.
- Clanton, T., Zuo, L., Klawitter, P. 1999. Oxidants and skeletal muscle function: Physiologic and pathophysiologic implications. *P.S.E.B.M.* 222: 253-262.
- Compagno, L. 2002. *Sharks of the World*. En: FAO (Ed.) Vol. II. 269 p.
- Corredor, A. S., Landines, M. A. 2009. Efecto del ácido ascórbico sobre la respuesta de los peces ante condiciones de estrés. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 56: 43-66.
- Crockett, E. L., Hazel, J. R. 1995. Cholesterol levels explain inverse compensation of membrane order in brush border but not homeoviscous adaptation in basolateral membranes from the intestinal epithelia of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 198: 1105-1113.
- Dabrowski, K., Lee, K.-J., Guz, L., Verlhac, V., Gabaudan, J., 2004. Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia and hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 233, 383–392
- Das, M., Das, D.K., 2008. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* 60, 199–203.
- De Anda-Montañez, J., García de León, F., Zenteno-Savín, T., Balart, E. F., Méndez- Rodríguez, L. C., Bocanegra-Castillo, N., Martínez-Aguilar, S., Campos-Dávila, L., Román-Rodríguez, M., Valenzuela-Quiñonez, F., Rodríguez-Jaramillo, M. C., Ramírez- Rosas, J. J., Saldaña-Hernández, J. I., Olguín-Monroy, N. O., Martínez-Delgado, M. E. 2013. Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción. In: Primera etapa convenio: FB1508/HK050/10. La Paz B.C.S.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad p111.

- De la Lanza-Espino, G. 2001. Características físico-químicas de los mares de México. En: Plaza y Valdez (Ed.). Instituto de Geografía, UNAM. México. 149 p.
- Drossos, G., Lazou, A., Panagopoulos, P., Westaby, S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Annals of Thoracic Surgery* 59: 169-172.
- Drouin, G., Godin, J. R., Pagé, B. 2011. The genetics of vitamin C loss in vertebrates. *Current Genomics*. 12: 371-378.
- Durán, A., Cisneros, A., Vargas, A. 2003. Bioestadística. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. pp. 222.
- Egaas, E., Falls, J.G., Svendsen, N.O., Ramstad, H., Shkaare J.U., Dauterman, W.C. (1995) Strain- and sex-specific differences in the glutathione S-transferase class pi in the mouse examined by gradient elution of the glutathione-affinity matrix and reverse-phase high performance liquid chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1243, 256- 264.
- Egginton, S., Sidell, B. D. 1989. Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 256:1-9.
- Evans, W. 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 72(suppl): 647S-52S.
- Fálder-Rivero, A. 2006. Productos del mar y de las aguas continentales. Enciclopedia de los alimentos. Distribución y consumo. 129 p.
- Fernández, C., San Miguel, E., Fernández-Briera, A. 2009. Superoxide dismutase and catalase: tissue activities and relation with age in the long-lived species *Margaritifera margaritifera*. *Biol. Res.* 42, 57-68.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. 2006. Oxidative stress. Relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36(4): 327-358.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E. y Niem, V. H. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. En: FAO (Ed.). Vol. II Vertebrados. Roma. 1200 p.

- Folh , L., G nzler, W. A. 1984. Assays for Glutathione peroxidase. En: Packer, L. (Ed.). *Methods in enzymology*, Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Inc. E.U.A. pp. 114-120.
- Gibb, A. C., Dickson, K. A. 2002. Functional morphology and biochemical indices of performance: is there a correlation between metabolic enzyme activity and swimming performance? *Integr. Comp. Biol.* 42: 199-207.
- Gieseg, S., Cuddihy, S., Hill, J., Davison, W. 2000. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B* 125, 371-378.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 2002. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed, Oxford Univ Press, London. 851 p.
- Goldberg, D. M., Spooner, R. J. 1987. Glutathione Reductase. En: Bermeyer-Ulrich, H. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, Vol III: Enzymes, I: Oxidoreductases transferases. VCH. Alemania. pp. 258-265.
- Goto, S., Rad k, Z. 2013. Implications of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *Sport and Health Science*. 1-6.
- Habig, W. H., Jakoby, H. B. 1981. Glutathione S-Transferases (Rat and Human). En: Jakoby, W. B. (Ed.). *Methods in enzymology*, Vol. 77. Academic Press, Inc. E.U.A. pp. 218-235.
- Grim, J., Miles, D., Crockett, E. 2010. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *Exper. Biol.* 213, 445-452.
- Grune T. 2000, Oxidative stress, aging and the proteasomal system, *Biogerontology*, 1: 31-40.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K. J. 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 709-718

- Guderley, H. 2004. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79: 409-427.
- Gutiérrez-Salinas, J. 2007. Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio. *Med. Int. Mex.* 23: 217-222.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University press, New York.
- Hammer, C. 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 1-20.
- Hart, P., Reynolds, J. 2002. *Handbook of fish biology and fisheries*. Volume 2. Fisheries. Blackwell, Publishing. Malden, USA. 413 p.
- Hegazi, M. M., Attia, Z. I., Ashour, O. A. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. *Aquatic toxicology*. 99: 118-125.
- Helsel, D. 1990. Less than obvious. Statistical treatment of data below the detection limit. *Environ. Sci. Technol.* 24(12): 1766-1774.
- Heller, J. H., Heller, M. S., Springer, S., Clark, E. 1957. Squalene content of various shark livers. *Nature*. 4566: 919-920.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. 133: 537-556.
- Hernández-Aguilar, S. B. 2008. Espectro trófico del tiburón azul *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) en la costa occidental de Baja California Sur, México. CICIMAR. Tesis maestría. 79 pp.
- Hudson, R.C. 1973. On the function of the white muscles in teleosts at intermediate swimming speeds. *J. Exp. Biol.* 58: 509-522.
- Izokun-Etiobhio, B.O., Oraedu, A.C.I., Ugochukwu, E.N. 1990. A comparative study of superoxide dismutase in various animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 521-523.
- Ji, L. 1995. Oxidative stress during exercise: Implication of antioxidant nutrients. *Free Rad. Biol. Med.* 18(6): 1079-1086.

- Ji, L. L., Leeuwenburgh, C., Leichtweis, S., Gore, M., Fiebig, R., Hollander, J., Bejma, J. 1998. Oxidative stress and aging: role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1): 102-117.
- Ji, L. L. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Exper. Biol. Med.*, 222(3): 283-292.
- Ji, L. L. 2002. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 959: 82-92.
- Ji, L. 2008. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Rad. Biol. Med.* 44: 142-152.
- Johnston, I. A. 1980. Specialization of fish muscle. In Goldspink DF (Ed.) *Development and specialization of skeletal muscle*. Cambridge University Press, New York, pp. 123-148.
- Johnston, I. A., Davison, W., Goldspink, G. 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.* 114: 203-216.
- Johnston, I., Maitland, B. 1980. Temperature acclimation in crucian carp, *Carassius carassius L.*, morphometric analyses of muscle fibre ultrastructure. *J. Fish. Biol.* 17: 113-125.
- Johnston, I. A., Patterson, S., Ward, P. S., Goldspink, G. 1974. The histochemical demonstration of myofibrillar adenosine triphosphatase activity in fish muscle. *Can. J. Zool.* 52: 871-877.
- Kakarla, P., Vadluri, G., Reddy, S. 2005. Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 303A: 203-208.
- Kieffer, J. 2010. Perspective-Exercise in fish: 50+years and going strong. *Comp. Biochem. and Physiol. Part A.* 156: 163-168.
- Kohler, N. E., Turner, P. A., Hoey, J. J., Natanson, L. J., Briggs, R. 2002. Tag and recapture data for three pelagic shark species: Blue shark (*Prionace glauca*), shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*), and porbeagle (*Lamna nasus*) in the north Atlantic Ocean. *Col. Vol. Sci. Pap.* 54 (4): 1231-1260.

- Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual moderno. México. 636 p.
- Kossmann, C. H. 1988. How do fish get their vital vitamin C?. Fish. Farm. Int. 5
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., 2010. Molecular mechanisms of turtle anoxia tolerance: a role for NF-kappaB. Gene 450, 63-69.
- Kuang, C. C. 1991. Vitamin E and oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 11: 215-232.
- Lercari, D., Chávez, E. A. 2007. Possible causes related to historic stock depletion of the totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Perciformes: Sciaenidae) endemic to the Gulf of California. Fisheries research. 86: 136-142.
- Ledezma-Gairard, M. 2004. Validación del Método: Determinación de vitamina C total por cromatografía líquida de alta resolución. Tecnología en marcha. 17(4).
- LeMoine, C., Craig, P., Dhekney, K., Kim, J. McClelland, G. 2010. Temporal and spatial patterns of gene expression in skeletal muscles in response to swim training in adult zebrafish. J. Comp. Physiol. B. 180: 151-160.
- Leveelahti, L., Rytönen, K. T. Renshaw, G. M. C., Nikinmaa, M. 2014. Revisiting redox-active antioxidant defenses in response to hypoxic challenge in both hypoxia-tolerant and hypoxia-sensitive fish species. Fish Physiol. Biochem. 40(1): 183-191.
- 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.
- Logue, J. A., DeVries, A. L., Fodor, E., Cossins, A. R. 2000. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. J. Exp. Biol. 203: 2105-2115.
- López-Cruz R. I., T. Zenteno-Savín, F. Galván-Magaña. 2010. Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle. Comp. Biochem. Physiol. 156(1): 50-56.

- Lluch-Belda, D., Elourduy-Garay, J., Lluch-Cota, S. E., Ponce-Díaz, G. 2000. BAC Centros de actividad biológica del Pacífico mexicano. CIBNOR. México. pp. 367.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Storey, J. M., Storey, K. B. 2001. Influence of exercise on the activity and the distribution between free and bound forms of glycolytic and associated enzymes in tissues of horse mackerel.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, J. M., Storey, K. B. 2005. Hipoxia and recovery perturb free radicals processes and antioxidant potencial in common carp (*Cyprinus carpio*). *Int. J. of Biochem. and cell Biol.* 37: 1319-1330.
- Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol, Part B.* 144: 283-289.
- Mæland, A., Waagbø, R. 1998. Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleost to synthesise ascorbic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.* 121: 249-255.
- Marcon, J., Wilhelm-Filho, D. 1999. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123, 257-263.
- Marini, M., Veicsteinas, A. 2010. The exercised skeletal muscle: a review. *European Journal Translational Myology-Myology Reviews.* 20(3): 105-120.
- Marinone, S. G., Lavín, M. F. 1977. Mareas y Corrientes residuales en el Golfo de California. En: M. F. Lavín (ed.), *Contribuciones a la oceanografía física en México. Monografía No. 3, Unión Geofísica Mexicana.* pp. 113-138.
- Market, M., Andrews, P. C., Babior, B. M. 1984. Measurement of O^2 production by human neutrophils. Academic Press, Orlando, Florida. pp. 358-365.
- Martínez-Álvarez, R. Morales, A. Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 15: 75-88.
- Marshall, N. B. 1966. *The life of fishes.* World Pub. Ed. Cleveland, Ohio.

- Mezes, M. 1986. Investigations of vitamin E and lipid peroxidation in blood and tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Hung.* 5: 71-78.
- Meydani, M., Evans, W. J., Handelman, G., Biddle, L., Fielding, A., Meydani, S. N., Burril, J., Fiatarone, M. A., Blumberg, J. B., Cannon, J. 1993. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *Am. J. Physiol.* 264: R992-R998.
- Moreau, R., Dabrowski, K. 1996. The primary localization of ascorbate and its synthesis in the kidneys of acipenserid (Chondrostei) and teleost (Teleostei) fishes. *J. Comp. Physiol. B.* 166: 178-183.
- Mortelette, H., Amérand, A., Sébert, P., Belhomme, M., Calvès, P., Moisan, C. 2010. Effect of exercise training on respiration and reactive oxygen species metabolism in eel red muscle. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 172: 201–205.
- Moyes, C. D., Schulte, P. M., Hochachka, P. W. Recovery metabolism of trout white muscle: role of mitochondria. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 262: R295–R304, 1992.
- Nakamoto, H., Kaneko, T., Tahara, S., Hayashi, E., Naito, H., Radák, Z., Goto, S. 2007. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Exp. Gerontol.* 42: 287–295.
- Nelson, J.S., 1994. *Fishes of the world*, 3 rd. ed. John Wiley and Sons, New York. p. 600.
- Ogonovszky, H., Berkes, I., Kumagai, S., Kaneko, T., Tahara, S., Goto, S., Radák, Z. 2005. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem. International.* 46: 635-640.
- Olson, R. J., Galván-Magaña, F. 2002. Food habits and consumption rates of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) in the Eastern Pacific Ocean. *Fish. Bull.* 100(2): 279-298.

- Otto, D., Moon, T. W. 1996. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. *Fish Physiol. Biochem.* 15(4): 349-358.
- Palstra, A., Planas, J. 2011. Fish under exercise. *Fish. Physiol. Biochem.* 37: 259-272.
- Passi, S., Cataudella, S., Di Marco, P., De Simone, F., Rastrelli, L. 2002. Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7314-7322.
- Pegau, W. S., Boss, E., Martínez, A. 2002. Ocean color observations of eddies during the summer in the Gulf of California. *Geophys. Res. Lett.* 29.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G. 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates-I. Antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B: 749-755.
- Persky, A. M., Green, P. S., Stublely, L., Howell, C. O., Zaulyanov, L., Brzaeau, G. A., Simpkins J. W. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 223: 59-66.
- Piiper, J., Meyer, M., Worth, H., Willmer, H. 1977. Respiration and circulation during swimming activity in the dogfish *Scyliorhinus stellaris*. *Resp. Physiol.* 30: 221-239.
- Plaut, I. 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp. Biochem. Physiol.* 131: 41-50.
- Powers, S.K., Ji, L.L., Leeuwenburgh, C., 1999. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31(7): 987-997.
- Powers, S. K., Jackson, M. J. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88: 1243-1276.

- Radak, Z., Apor, P., Pucsok, J., Berkes, I., Ogonovszky, H., Pavlik, G., Nakamoto, H., Goto, S. 2003 Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci.* 72: 1627-1633.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S. 1999. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic. Biol. Med.* 27(1-2): 69-74.
- Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucdok, J., Sasvari, M. 2001a. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem. Int.* 38: 17-23.
- Radák, Z., Naito, H., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Cardozo-Pelaez, S. 2002. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *445*: 273-278.
- Radák, Z., Taylor, A. W., Ohno, H., Goto, S. 2001b. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc. Immunol Rev.* 7: 90-107.
- Radák, Z., Young, H., Goto, S. 2008. Systematic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine.* 44: 153-159.
- Renshaw, G., Kutek, A. K., Grant, G. D., Anoopkumar-Dukie, S. 2012. Forecasting elasmobranch survival following exposure to severe stressors. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 162: 101-112.
- Richards, J. G. Heigenhauser, G. J. F. Wood, C. M. 2003. Exercise and recovery metabolism in the pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J. Comp. Physiol Part B.* 173: 463-474.
- Rocha-e-Silva, T.A.A., Rossa, M.M., Rantin, F.T., Matsumura-Tundisi, T., Tundisi, J.G., Degterev, I.A. 2004. Comparison of liver mixed-function oxygenase and antioxidant enzymes in vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 137C: 155–165.
- Rodríguez-Romero, J., Álvarez-Bauman, E., Ochoa-Díaz, M. R., López-Martínez, J., Maldonado-García, M. 2013. Feeding habits of *Mustelus henlei* on the

- western coast of Baja California Sur, México. *Biol. Marina y Ocean.* 48(2): 261-271.
- Rowell, K., True, C., Flessa, K. W., Dettman, D. L. 2008. Peces sin agua: Validación y aplicación de $\delta^{18}O$ en los otolitos de *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias marinas.* 34(1): 55-68.
- Rudneva, I.I. 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleost. *Comp. Biochem. Physiol.* 118C: 255–260.
- Rudneva, I. I., Kuzminova, N. S., Skuratovskaya, E. N., Kovyrshina, T. B. 2010. Comparative study of glutathione-S-transferase activity in tissues of some black sea teleosts. *Int. J. Sci. Nat.* 1(1): 1-6.
- Rudneva, I. I., Dorokhova, I. I., Skuratovskaya, E. N., Kuz'minova, N. S. 2014. Comparative studies of hepatic and blood biomarkers in three species of Black Sea elasmobranchs. *Int. J. Marine Sc.* 44(4): 1-14.
- Ruff, N., Fitzgerald, R. D., Cross, T. F., Hamre, K., Kerry, J. P. 2003. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. *Aquaculture Nutrition.* 9: 91-103.
- Sánchez-Rodríguez, M., Santiago-Osorio, E., Vargas, L. A., Mendoza-Núñez, V. M. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica.* 29(3): 81-90.
- Sevilla-Rodríguez, H. 2013. Ciclo reproductivo del marlín rayado (*Kajikia audax*) en Cabo San Lucas, Baja California Sur, México. CICIMAR. Tesis maestría. 53 p.
- Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of free amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 797-821.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L. 2000. Protein oxidation. *Ann.NY Acad. Sci.* 899: 191-208.
- Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91: 31-38.

- Silva-Santos, J. R. 2012. Biología reproductiva del tiburón mamón pardo *Mustelus henlei* (Gill, 1863) en la costa occidental de Baja California Sur, México. CICIMAR. Tesis maestría. 95 p.
- Sippel, T., Holdsworth, J., Dennis, T., Montgomery, J. 2011. Investigating behavior and population dynamics of striped marlin (*Kajikia audax*) from the Southwest Pacific Ocean with satellite tags. PLOS one. 6(6): 1-13.
- Supelco. 2003/2004. Productos de cromatografía para análisis y purificación. México. USA. pp. 146-147.
- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu,Zn-SOD. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J. (Eds.). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press. R. U. pp. 91-95.
- Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of free amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annu. Rev. Biochem. 62: 797-821.
- Stanfield, P. R. 1972. Electrical properties of white and red muscle fibers of elasmobranch fish *Scyliorhinus canicula*. J. Physiol. 222: 161-186.
- Stephan, G., Guillaume, J., Lamour, F. 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. Aquaculture. 130: 251-268.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 1715-1733.
- Szweda, L. I., Stadtman, E. R. 1992. Iron-catalyzed oxidative modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Journal of Biological Chemistry. 267: 3096-3100.
- 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.
- Tocher, D. R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J. O., Diaz, E., Bell, J. G., Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y. 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*

- L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition*. 8: 195-207.
- Trenzado, C., Hidalgo, M. C., García-Gallego, M., Morales, A., Furné, M., Domezain, A. Domezain, J., Sanz, A. 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*. 254: 758-767.
- Tripp-Valdez, A. 2005. Ecología trófica del dorado *Coryphaena hippurus* (Linnaeus, 1758) en dos áreas del sur del Golfo de California. CICIMAR. Tesis maestría. 125 p.
- Urso, M., L., Clarkson, P., M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 189: 41-54.
- Velasco-Tarelo, P. M. 2005. Hábitos alimenticios e isótopos de ^{13}C y ^{15}N del tiburón mako *Isurus oxyrinchus* (Rafinesque, 1810) en la costa occidental de Baja California Sur. CICIMAR. Tesis maestría. 97 p.
- Verlhac, V., Gabaudan, J. 1997. The effect of vitamin C on fish health. DSM Nutritional Products. Switzerland. 35 p.
- Wang, X., Wu, L., Aouffen, M., Mateescu, M.A., Nadeau, R., Wang, R. 1999. Novel cardiac protective effects of urea: from shark to rat. *Br. J. Pharmacol*. 128: 1477-1484.
- Watson, R. R., Dickson, K. A. 2001. Enzyme activities support the use of liver lipid-derived ketone bodies as aerobic fuels in muscle tissues of active sharks. *Physiol Biochem Zool* 74: 273-282.
- Webb, P. W. 1975. Hydrodynamics and energetics of fish propulsion. *Bull. Fish Res. Board Can.* No. 190, 158 p.
- Wilhelm-Filho, D., Boveris, A. 1993. Antioxidant defenses in marine fish-II. Elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C(2): 415-418.
- Wilhelm-Filho, D. Giulivi, C., Boveris, A. 1993. Antioxidant defenses in marine fish-I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C(2): 409-413.
- Wilhelm-Filho, D. 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Frontiers in Biosci.* 12: 1229-1237.

- Wodtke, E. 1978. Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperatures. Phospholipid composition, fatty acid pattern, and cholesterol content. *Biochim. Biophys. Acta.* 529: 280-291.
- Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., Essigmann, J.M. 1990. *Biochemistry.* 29: 7024-7032.
- Zammit, V.A., Newsholme, E.A., 1979. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. *Biochem. J.* 184: 313–322.