



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**COMPARACIÓN DE LOS INDICADORES DE
ESTRÉS OXIDATIVO ENTRE DIFERENTES
ESPECIES DE ODONTOCETOS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

p r e s e n t a

Nadiezha Cantú Medellín

La Paz, B.C.S. Noviembre del 2008

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 31 del Mes de octubre del 2008, 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:

“Comparación de los indicadores de estrés oxidativo entre diferentes especies de odontocetos”

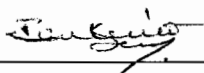
Presentada por el alumno:

Nadiezhdha Cantú Medellín

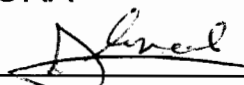
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología Marina

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

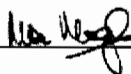
LA COMISION REVISORA



Dra. Tania Zenteno Savín
DIRECTORA DE TESIS



Dr. Adolfo García González
CO-TUTOR



Marc Mangel Ph.D.
CO-TUTOR



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

COMITÉ TUTORIAL

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

Dr. Marc Mangel (University of California, Santa Cruz)

Dr. Adolfo García González (Instituto Mexicano del Seguro Social)

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Tania Zenteno Savín (CIBNOR)

Dr. Marc Mangel (UCSC)

Dr. Adolfo García González (IMSS)

JURADO DEL EXÁMEN DE GRADO

Dra. Tania Zenteno Savín (CIBNOR)

Dr. Adolfo García González (IMSS)

Dra. Elena Palacios Mechetnov (CIBNOR)

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

Resumen

Los odontocetos son un grupo de mamíferos marinos con diferencias marcadas en las profundidades y tiempos de buceo. Los delfines son especies activas que se alimentan de peces y que suelen hacer buceos someros de corta duración. Los cachalotes del género *Kogia* son reconocidos por su nado pasivo y su capacidad para realizar buceos prolongados, para alimentarse de calamares, cangrejos y mísidos. La respuesta al buceo en mamíferos resulta en una bradicardia y vasoconstricción periférica, con redistribución del flujo sanguíneo preferentemente a tejido nervioso y cardiaco. Por efecto de estas respuestas algunos tejidos quedan expuestos a condiciones de isquemia durante el buceo, y una vez que el organismo sube a la superficie, con la primera respiración después del buceo, se restablece el flujo sanguíneo a los tejidos (reperusión). Durante el ciclo de isquemia-reperusión ocurre un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que puede generar en daño oxidativo. Los organismos han desarrollado un sistema de defensas antioxidantes para prevenir o reparar dicho daño. No se sabe si la profundidad y el tiempo de buceo provocan una variación en la producción de ERO y la actividad de moléculas encargadas de neutralizarlas en mamíferos buceadores. La hipótesis de este trabajo es que la producción de ERO, las defensas antioxidantes y el daño oxidativo varían de acuerdo al grado de isquemia al que se sometan los buceadores someros (delfines) y buceadores profundos (kogias). Se midió la producción de radical superóxido (O_2^-), el daño oxidativo a lípidos y proteínas, así como la actividad de enzimas antioxidantes y los niveles de los componentes del sistema glutatión (GSH) como indicadores del estrés oxidativo en tejidos de delfines y kogias. Se encontró que estos indicadores varían entre tejidos de un mismo grupo, dependiendo de las funciones y metabolismo de cada tejido, y que las diferencias en los hábitos de buceo de delfines y kogias, se ven reflejadas en sus niveles de prooxidantes y antioxidantes. Es posible que las diferencias en la producción de O_2^- y las defensas antioxidantes entre buceadores someros y profundos les permitan mantener el balance del estado oxido-reducción durante y después del buceo.

Palabras clave: antioxidantes, respuestas al buceo, odontocetos, isquemia-reperfusión.

Vo.Bo. Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de tesis

Abstract

Odontocets are a diverse group of marine mammals with wide differences in diving depth and duration. Dolphins are very active species that feed mostly on fishes and perform shallow and short dives. Sperm whales of the genus *Kogia* are recognized for their passive swimming and capacity to perform long and deep dives to feed on squid, crab and mysids. The diving response in mammals results in a bradycardia and peripheral vasoconstriction with blood flow redistribution, preferentially to nervous and cardiac tissues. Due to these responses some tissues are exposed to ischemic conditions during a dive, and, once at the surface, with the first breath after the dive, the blood flow to the tissues is reestablished (reperfusion). The reactive oxygen species (ROS) production increases during each ischemia-reperfusion cycle and oxidative damage can occur. The organisms have an antioxidant defense system to prevent, or repair this damage. It is unknown if the depth and duration of the dive influence the ROS production and the antioxidants defenses in diving mammals. The hypothesis of this work is that ROS production, the antioxidant defenses and the oxidative damage vary according to the degree of ischemia to which shallow divers (dolphins) and deep divers (kogias) are exposed. We measured the superoxide radical production ($O_2^{\cdot-}$), the oxidative damage to lipids and proteins, the activity of antioxidant enzymes, and the levels of the components of the glutathione system (GSH) as oxidative stress indicators in tissues from dolphins and kogia. We found that these indicators vary among tissues within each group, according to the functions and metabolism of each tissue, and that differences in the diving behavior of dolphins and kogias, are reflected in the prooxidant and antioxidant levels. These differences in $O_2^{\cdot-}$ production and antioxidant defenses between shallow and deep divers appear to contribute to the maintenance of the redox balance during and after a dive.

Key words: antioxidants, diving responses, odontocets, ischemia-reperfusion.

Vo.Bo. Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de tesis

A Victoria Medellín Anaya

Y

Roberto Cantú Ríos

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 206397, al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y al departamento de posgrado del CIBNOR. A mi directora de tesis la Dra. Tania Zenteno Savín, gracias Tania por tu apoyo y dirección, por confiar en mí y por tener siempre un tiempo para tus estudiantes y sus múltiples preguntas. En todo este tiempo has sido un gran ejemplo para mí como investigadora, como persona y como amiga. Lo que aprendí contigo en estos años lo llevo conmigo por siempre y espero más colaboraciones en el futuro. Al resto de mi comité tutorial: al Dr. Adolfo García González, muchísimas gracias por creer en esta idea y por animarte a compartir con nosotros la experiencia de este trabajo. To Dr. Marc Mangel, thanks a lot Marc for all the advices and for your time, I feel very pleased to share this work with you and your laboratory and to be introduced in the magical world of mathematical models, even when it was just a small start it was very exciting.

Quiero agradecer al departamento de posgrado por el apoyo para asistir al Annual Meeting of Free Radical Biology and Medicine en Washington DC, E.U.A., en noviembre del 2007. Así como a las chicas del área de posgrado del CIBNOR, a Bety, Osvelia, Claudia, Lety, Lupita y la Dra. Thelma, por ayudarnos en todo este tiempo de maestría, es decir, desde la inscripción hasta la titulación, gracias chicas por su paciencia y su tiempo, y una disculpa si a veces pareciera que las queremos volver locas, es solo que probablemente nosotros ya lo estemos. También un agradecimiento al centro de cómputo de posgrado, a Horacio y Manuel por toda la ayuda técnica con las computadoras y por no desesperar cuando estamos a punto del colapso nervioso porque sabe Dios que le picamos a la compu y ya nos borró todo. Agradezco también al personal de biblioteca, por la ayuda en la búsqueda de bibliografía, de libros y artículos. Y por último quiero agradecer al personal de seguridad del CIBNOR, por acompañarme y alumbrar el camino al carro cuando salía muy tarde del laboratorio o de posgrado.

A la familia De la Toba que ayudó en la colecta de muestras en el puerto A. López Mateos, B.C.S. y al Dr. Craig Harms, North Carolina State University, College

of Veterinary Medicine, a la Dra. Aleta Hohn, Barbie Byrd y Gretchen Lovewell, NOAA/NMFS Stranding Network y a los numerosos participantes del North Carolina Marine Mammal Stranding Network que ayudaron en la colecta de muestras en Carolina del Norte, EUA.

A los laboratorios de Ecología de Química y Toxicológica y de Bioquímica Fisiológica donde se me permitió realizar los análisis bioquímicos de las muestras. Particularmente quiero dar un agradecimiento a los técnicos Norma Olguín Monroy, Orlando Lugo Lugo y la estudiante Lourdes del Carmen López Meza por su apoyo técnico en la parte de análisis bioquímico. Así como a los integrantes de la “secta” de estrés oxidativo, a Norma, Nelly, Roberto, Paty, Paola, Vanessa, José Pablo, Orlando, Citlali, Juan Carlos, Dwight, Rogelio y Lázaro, muchas gracias por sus consejos y comentarios y por ser tan alivianados.

Quiero dar un agradecimiento especial al Dr. Gerardo Ferrer Sueta (Universidad de la República de Uruguay), al M.C. José Pablo Vázquez Medina (University of California in Merced, CA, EUA) y al Lic. Darío Ariel Vitturi Iglesias (University of Alabama in Birmingham, AL, EUA), por los comentarios y recomendaciones otorgados a este trabajo. Por sus consejos, apoyo y disponibilidad. Por ser amigos y referencia a la vez. Fue un honor para mí que hayan leído mi tesis.

A Aracely Rojas Sierra, a Darío Vitturi Iglesias y a Alba Meléndez Ávalos por ayudarme a traducir la tesis. No saben el favor enorme que me hicieron. Muchas gracias por su tiempo y apoyo.

Agradezco a mis padres de todo corazón, por creer en mí, por confiar en mis ideas por más locas que les parecieran a veces, por estar ahí en todo momento y en todo lugar. Ustedes son mi inspiración y mi ejemplo a seguir. Espero en algún momento llegar a tener aunque sea la mitad de sabiduría que tiene ustedes. Los querré para siempre. ¡Son los mejores!

Agradezco tanto a Fabiola Guerrero y Aracely Rojas por su amistad. Reinas saben lo importante que son para mí y lo feliz que me hace haber compartido estos 8 años con ustedes. Las quiero y admiro un montón, y aunque nuestras vidas tomen caminos diferentes sé que tarde o temprano (espero que más temprano que tarde) tendremos que reunirnos de nuevo. La liga de la justicia solo crece pero no se desvanece.

Quiero agradecer a Arlett Robles y Raúl Llera por su amistad, su apoyo, sus risas y su tiempo. Saben que les deseo todo el éxito del mundo y que esta amistad perdure a pesar de la distancia. También quiero agradecer al resto de mis compañeros de maestría, en especial a Elio por esos ratos de buena música, risa y buen café, y a Paulina, Getzabeth, Angélica, Yssel y Verónica por sus pláticas anti-estrés y sus consejos.

Un profundo agradecimiento a todos mis amigos que a lo largo de estos 2 años me han apoyado de una u otra manera, han aguantado mi histeria durante los periodos de estrés y han confiado en mí y en mi trabajo: Alba y su Chemis, Zaida, Gaby, Minerva, Alinne, Yvonne, Regio, Iván. Román, Ismael, Arturo, Barbarita, Mauro, Emmanuel, Edgar, Wicho, Roberto, Gaby, Chunga, Lili, Jessica y a mis hermanas: Sandy, Pivi y Daniela.

Y por último, gracias Darío por tu apoyo y tu confianza, por saber siempre cómo hacerme reír, que olvide los problemas y siga adelante. Por tener esa capacidad de saber qué decir y cuándo. Por cuidarme y mimarme incluso en esos momentos que quizá no lo merecía, por darme esa sonrisa que me hace sonreír y sobre todo por hacerme inmensamente feliz. No sabes lo que significa para mí tenerte en esta etapa de mi vida y compartir contigo el cierre de este ciclo, para así comenzar juntos uno nuevo. Ahora sí, a echarle ganas en esta nueva etapa.

Contenido

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
GLOSARIO	IV
ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS	16
4.1. OBJETIVO GENERAL	16
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	16
5. MATERIAL Y MÉTODOS	17
5.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	17
5.2 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS	17
5.2.1 Producción de radical superóxido	17
5.2.2. Daño oxidativo	18
5.2.2.1. Peroxidación de lípidos	18
5.2.2.2. Carbonilos proteicos	19
5.2.3. Actividad de enzimas antioxidantes	20
5.2.3.1. Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)	20
5.2.3.2. Catalasa (EC 1.11.1.6)	21
5.2.3.3. Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)	22
5.2.3.4. Glutación-S-transferasa (EC 2.5.1.18)	23
5.2.3.5. Glutación disulfuro reductasa (EC 1.6.4.2)	24
5.2.4. <i>Glutación y glutación disulfuro</i>	24
5.2.5. <i>Proteínas solubles</i>	26
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	26
6. RESULTADOS	28
6.1. DIFERENCIAS ENTRE TEJIDOS	28

6.1.1. Delfines	28
6.1.1.1. Producción de radical superóxido	28
6.1.1.2. Daño oxidativo. Niveles de TBARS y carbonilos proteicos	29
6.1.1.3. Actividad de las enzimas antioxidantes	30
6.1.1.4. Glutación y glutatión disulfuro.....	32
6.1.1.5. Correlaciones por tejido.....	33
6.1.2. <i>Kogia</i> spp.	34
6.1.2.1. Producción de radical superóxido.....	34
6.1.2.2. Daño oxidativo. Niveles de TBARS y carbonilos proteicos	35
6.1.2.3. Actividad de las enzimas antioxidantes	36
6.1.2.4. Glutación y glutatión disulfuro.....	38
6.1.2.5. Correlaciones por tejido.....	39
6.2. DELFINES VS. KOGIAS	40
6.2.1. Producción de radical superóxido.....	40
6.2.2. Daño oxidativo. Niveles de TBARS y carbonilos proteicos	40
6.2.3. Actividad de las enzimas antioxidantes	41
6.2.4. Glutación y glutatión disulfuro.....	44
7. DISCUSIÓN	45
7.1. DIFERENCIAS ENTRE TEJIDOS DE DELFINES Y KOGIAS DE LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	45
7.2. DIFERENCIAS DE LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO ENTRE DELFINES Y KOGIAS	58
7.3. MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MAMÍFEROS MARINOS CON USO EN BIOMEDICINA	66
8. CONCLUSIONES	71
9. PERSPECTIVAS.....	72
10. BIBLIOGRAFÍA	73
11. ANEXOS.....	84

Lista de figuras

Figura 1. Metabolismo oxidativo.....	8
Figura 2. Producción de radical superóxido en tejidos de delfines.....	29
Figura 3. a) Niveles de peroxidación de lípidos y b) carbonilos proteicos en tejidos de delfines.....	29
Figura 4. Actividad de las enzimas: a) superóxido dismutasa; b) superóxido dismutasa dependiente de manganeso; c) superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc; c) catalasa en tejidos de delfines.....	30
Figura 5. Actividad de las enzimas: a) glutatión S-transferasa; b) glutatión peroxidasa; c) glutatión reductasa en tejidos de delfines.....	31
Figura 6. a) contenido total de glutatión; b) de glutatión disulfuro; c) de glutatión reducido; d) tasa de GSSG:GSH-Eq en tejidos de delfines.....	32
Figura 7. Producción de radical superóxido en tejidos de kogias.....	35
Figura 8. a) Niveles de peroxidación de lípidos y b) carbonilos proteicos en tejidos de kogias.....	35
Figura 9. Actividad de las enzimas: a) superóxido dismutasa; b) superóxido dismutasa dependiente de manganeso; c) superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc; c) catalasa en tejidos de kogias.....	36
Figura 10. Actividad de las enzimas: a) glutatión S-transferasa; b) glutatión peroxidasa; c) glutatión reductasa en tejidos de kogias.....	37

Figura 11. a) contenido total de glutatión; b) de glutatión disulfuro; c) de glutatión reducido; d) tasa de GSSG:GSH-Eq en tejidos de kogias.....	38
Figura 12. Producción de radical superóxido en tejidos de kogias y delfines.....	40
Figura 13. a) Niveles de peroxidación de lípidos y b) carbonilos proteicos en tejidos de kogias y delfines.....	41
Figura 14. Actividad de las enzimas: a) superóxido dismutasa; b) superóxido dismutasa dependiente de manganeso; c) superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc; c) catalasa en tejidos de kogias y delfines.....	42
Figura 15. Actividad de las enzimas: a) glutatión S-transferas; b) glutatión peroxidasa; c) glutatión reductasa en tejidos de kogias y delfines.....	43
Figura 16. a) contenido total de glutatión; b) de glutatión disulfuro; c) de glutatión reducido; d) tasa de GSSG:GSH-Eq en tejidos de kogias y delfines.....	44

Lista de tablas

Tabla I. Producción de radical superóxido, niveles de TBARS y de carbonilos proteicos en tejidos de delfines.....	28
Tabla II. Producción de radical superóxido, niveles de TBARS y de carbonilos proteicos en tejidos de kogias.....	34

Glosario

Acidosis: acumulación de iones H^+ .

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

Antioxidantes: moléculas que actúan sobre oxidantes para prevenir, reparar o detener el daño causado por éstos, y que poseen afinidad hacia uno o varios oxidantes.

Asfixia: conjunción de hipoxia, hipercapnia y acidosis.

Apnea: suspensión voluntaria de la respiración.

Bradycardia: disminución del ritmo cardiaco.

Carbonilos proteicos: modificación irreversible a las proteínas, dadas por la formación de un grupo carbonilo en los aminoácidos de las cadenas laterales cuando fueron oxidadas por especies reactivas de oxígeno.

Daño oxidativo: modificación por especies reactivas de oxígeno a biomoléculas importantes para la célula, que puede llegar a producir alteración en el funcionamiento o muerte celular

Especies reactivas de oxígeno: radicales libres o moléculas derivadas del oxígeno y que pueden producir radicales libres o ser activadas químicamente por ellos.

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

Estrés oxidativo: condición fisiopatológica que ocurre cuando la producción de especies reactivas de oxígeno sobrepasa la capacidad de los antioxidantes para neutralizarlas.

Hipercapnia: incremento en la concentración de dióxido de carbono.

Hipoxia: disminución de la concentración de oxígeno.

Isquemia: disminución del flujo de sangre oxigenada.

Límite de buceo aerobio: tiempo de buceo después del cual existe un incremento en la concentración de lactato en la sangre debido al inicio del uso de metabolismo anaerobio.

Odontocetos: Mamíferos marinos que pertenecen al Orden Cetácea, y en los que se incluyen delfines, marsopas, zifidos y cachalotes.

Peroxidación lipídica: oxidación de lípidos insaturados.

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

Reservas totales de oxígeno: concentración total de oxígeno en la sangre (hemoglobina) y en los tejidos (mioglobina, neuroglobina, etc.).

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

Reoxigenación: reintroducción de oxígeno.

Reperusión: restablecimiento del flujo de sangre oxigenada.

Xenobióticos: compuestos químicos sintetizados en un laboratorio y que por su estructura pueden persistir mucho tiempo en el ambiente sin alterarse.

Vasoconstricción periférica: redistribución del flujo sanguíneo con preferencia al sistema nervioso central y corazón.

Abreviaturas

ADL: Límite de buceo aerobio (por sus siglas en inglés)

ADP: Adenosin difosfato

AIA: Artritis adyuvante inducida

AMP: Adenosín monofosfato

AOX: Capacidad antioxidante total

ATP: Adenosín trifosfato

CAT: Catalasa

CO₂: Dióxido de carbono

CTE: Cadena de transporte de electrones

ERO: Especies reactivas de oxígeno

G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación disulfuro reductasa

GS: Glutación sintetasa

GSH: Glutación reducido

GSH-Eq: Equivalentes de glutación (glutación total)

GSSG: Glutación disulfuro o glutación oxidado

GST: Glutación-S-transferasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

Hb: Hemoglobina

HIF-1: Factor inducible por hipoxia 1

HO: Radical oxhidrilo

HOAD: β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa

HX: Hipoxantina

IMP: Inosín monofosfato

LDH: Lactato deshidrogenasa

Mb: Mioglobina

MDA: Malondialdehído

NADP⁺: Dinucleótido de nicotinamina adenina fosforilado

NADPH: Dinucleótido de nicotinamina adenina fosforilado reducido

NF- κ B: Factor nuclear- κ B

NO \cdot : Óxido nítrico

NOX: NADPH oxidasa

O₂: Oxígeno molecular

O₂ \cdot^- : Radical superóxido

¹O₂: Oxígeno singulete

RNG: Globinas neurales residentes

SOD: superóxido dismutasa

SOD-CuZn: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

SOD-Ec: Superóxido dismutasa extracelular

SOD-Mn: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobartibúrico

X: Xantina

XDH: Xantina deshidrogenasa

XO: Xantina oxidasa

1. Introducción

Los cetáceos (Orden Cetacea) son un grupo diverso que incluye 83 especies divididas en dos grandes Subórdenes: Mysticeti (ballenas con barbas) y Odontoceti (ballenas dentadas, delfines y marsopas) (IWC, 2007).

Los odontocetos incluyen 10 familias con por lo menos 71 especies, las cuales se agrupan en 3 principales superfamilias: Delphinoidea (delfines verdaderos, monodontidos y marsopas), Ziphoidea (ballenas picudas) y Physeteroidea (cachalotes) (IWC, 2008). Con excepción del cachalote y algunas ballenas picudas, la mayoría de los odontocetos son cetáceos pequeños que miden de 1.5 a 8.5 m (LeDuc, 2002).

La alimentación de los odontocetos varía dependiendo de la especie. La mayoría de los delfines se alimenta de bancos de peces y algunos calamares que habitan en profundidades someras o que habitan a grandes profundidades pero que migran hacia la superficie durante la noche (Ballance, 2002). El cachalote (*Physeter macrocephalus*) es considerado macroteutófago mesopelágico, ya que se alimenta principalmente de calamares y realiza buceos largos y profundos para cazarlos (Whitehead, 2002; Ballance, 2002). El cachalote pigmeo y cachalote enano (*Kogia breviceps* y *K. sima*, respectivamente) se alimentan principalmente de calamares, pulpos, mrisidos y cangrejos de aguas profundas. En algunas ocasiones estas 2 especies comparten presas entre si y con el cachalote (Cardona-Maldonado y Mignucci-Giannoni, 1999; Beatson, 2007).

Además de la necesidad de alimentación, los odontocetos realizan buceos para protegerse de depredadores como tiburones y orcas. En el caso de los delfines el buceo también es utilizado como parte de la socialización entre organismos de un mismo grupo (Elsner, 2002; Wells y Scott, 2002). Durante el buceo los mamíferos marinos

están expuestos a una asfixia progresiva que comienza cuando el organismo se sumerge y realiza una apnea, es decir, una suspensión voluntaria de la respiración (Kooyman, 1989). Al principio del buceo se utiliza el oxígeno (O_2) almacenado en la sangre (hemoglobina, Hb) y en el músculo esquelético (mioglobina, Mb), principalmente (Kooyman, 1989; Elsner, 1999). Sin embargo, una vez que las reservas de O_2 disminuyen (hipoxia), se incrementa el contenido de dióxido de carbono (CO_2) (hipercapnia) y eventualmente hay una acumulación de los productos del metabolismo anaerobio, como ácido láctico e iones de hidrógeno (acidosis) (Kooyman y Ponganis, 1998; Elsner, 1999).

La mayoría de los buceos que realizan los mamíferos marinos se mantienen dentro del límite de buceo aerobio (ADL, por sus siglas en inglés), el cual se define como el buceo más largo que ocurre sin que se incrementen las concentraciones de ácido láctico en la sangre, durante o después del buceo (Kanatous et al., 1999). Si el organismo sobrepasa su ADL, se expone a prolongar el tiempo en superficie después de un buceo para pagar la deuda de O_2 y recargar las reservas del mismo y metabolizar los niveles de ácido láctico acumulado y restablecer sus niveles en sangre (Kooyman, 1989). Los mamíferos marinos han desarrollado una serie de respuestas al buceo que les permiten administrar los niveles de O_2 en el cuerpo y, por lo tanto, bucear por periodos relativamente largos. Dichas respuestas han sido estudiadas durante décadas por diversos laboratorios (Hochachka y Storey, 1975; Kooyman et al., 1981; Williams et al., 1999a; Williams et al., 1999b; Skrovan et al., 1999; Castellini et al., 2001) y se han manejado 3 mecanismos principales de respuesta al buceo en mamíferos marinos. 1) La bradicardia, reducción del ritmo cardiaco durante el buceo; 2) vasoconstricción periférica, que resulta en un cambio de la distribución sanguínea, manteniendo un flujo

sanguíneo intermitente al miocardio y sistema nervioso central y un flujo disminuido en el músculo esquelético y órganos resistentes a hipoxia como el hígado y el riñón (Butler y Jones, 1997; Elsner et al., 1998; Kooyman y Ponganis, 1998; Kanatous et al., 1999); y 3) un aumento en el volumen sanguíneo y las concentraciones de Hb y Mb en comparación con mamíferos terrestres, por lo que tienen mayor capacidad de almacenar O₂ (Kooyman, 1989). Se ha encontrado que, incluso dentro de los mamíferos marinos, las especies que bucean por más tiempo y más profundo tienen una mayor capacidad para transportar y almacenar el O₂, y así mantener los niveles de O₂ por más tiempo en los tejidos (Noren y Williams, 2000; Noren et al., 2005).

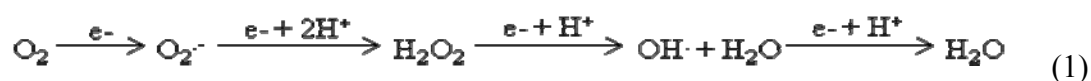
Los órganos isquémicos (aquellos que experimentan disminución del flujo sanguíneo) pueden sufrir daños severos. La disminución en la producción de ATP por hipoxia causa despolarización de la membrana citoplasmática (debido a la alteración de las bombas Na⁺/K⁺) y modifica la homeostasis de Ca⁺, aumentando el calcio citoplasmático y la activación de fosfolipasas y proteasas dependientes de Ca⁺ (Lipton, 1999; Hermes-Lima, 2004b). Sin embargo, existe otro problema una vez que el flujo de sangre es reintroducido (reperfusión). Cuando los órganos isquémicos reciben el aporte de sangre oxigenada durante la reperfusión ocurre una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), y si éstas son producidas en exceso pueden sobrepasar la capacidad antioxidante provocando un estado de estrés oxidativo en la célula (Hermes-Lima, 2004b; Kevin et al., 2005; Halliwell y Gutteridge, 2007). En el caso de los mamíferos marinos esto puede ocurrir cuando toman la primera bocanada de aire después del buceo, y se restablece el flujo de sangre a todos los órganos y tejidos (Elsner et al., 1998; Zenteno-Savín et al., 2002).

Las ERO pueden ser radicales libres (radical superóxido y radical hidroxilo), moléculas reactivas derivadas del O₂ (peróxido de hidrógeno) y moléculas que pueden producir radicales libres o ser activadas químicamente por ellos (Lesser, 2006). Los radicales libres son moléculas que en su último orbital tienen uno o más electrones desapareados, lo que las hace muy inestables y altamente reactivas (Hermes-Lima, 2004a; Halliwell & Gutteridge, 2007). Cuando son producidas en exceso, las ERO causan graves daños a la célula ya que reaccionan con los lípidos de las membranas celulares, con proteínas importantes en el funcionamiento celular, con las bases púricas y pirimídicas del ADN, así como con el esqueleto de desoxirribosas, lo cual puede causar daño reversible o permanente a la célula (Dalle-Donne et al., 2006a; Valko et al., 2007).

La formación de ERO en el organismo puede ocurrir por fuentes exógenas o endógenas. Por fuentes exógenas las ERO pueden ser producidas por ionización, radiación UV o por el metabolismo de una gran cantidad de drogas o xenobióticos (Winterbourn, 2008). De manera endógena la formación de ERO ocurre principalmente dentro de la mitocondria, en la cadena de transporte de electrones (CTE) (Fridovich, 1978; Kevin et al., 2005; Halliwell y Gutteridge, 2007; Winterbourn, 2008). Durante la respuesta inmune en los organismos existe una producción de ERO que son utilizadas como defensa contra patógenos en células fagocíticas, tales como neutrófilos. Dentro de esta respuesta está la actividad del complejo enzimático de las NADPH oxidasas (NOXs), en el cual se encuentran algunas flavoproteínas y otras moléculas, que cuando se activan se trasladan a la membrana celular y se encargan de reducir el O₂ a radical superóxido (O₂⁻) (Valko et al., 2007; Winterbourn, 2008). Otra de las fuentes

endógenas de ERO es la formación del sistema xantina/xantina oxidasa (X/XO) (Winterbourn, 2008)

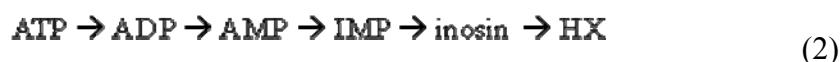
Las fuentes endógenas de ERO relacionadas con el fenómeno de isquemia reperfusion son la CTE y el sistema X/XO (Hermes-Lima, 2004b; Valko et al., 2007). Dentro de la primera, de manera natural ocurre una reducción monovalente del O₂ en el complejo I (NADH coenzima Q reductasa, también llamada ubiquinona reductasa), y en el complejo III (ubiquinol citocromo c reductasa) ocurre la formación de radical superóxido (O₂^{•-}) (Reacción 1) (Fridovich, 1978; Kevin et al., 2005; Halliwell y Gutteridge, 2007). Este proceso se acelera de manera significativa cuando después de un periodo de hipoxia ocurre una reintroducción abrupta de O₂, ya que durante la hipoxia disminuye la actividad del complejo IV (citocromo c) y cuando el O₂ es reintroducido, se acelera el flujo de radicales libres que provienen del complejo III. Por lo que se cree que este mecanismo es una fuente importante de ERO durante los ciclos de isquemia/reperfusion en mamíferos (Zenteno-Savín et al., 2002; Kevin et al., 2005; Vázquez-Medina, 2006).



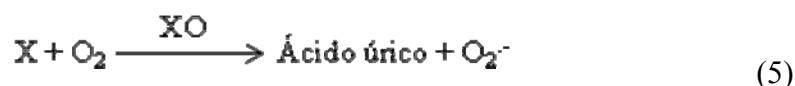
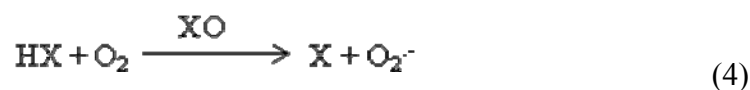
La formación de ERO por el sistema X/XO comienza cuando los tejidos entran en hipoxia y ocurre una acumulación de hipoxantina (HX) y xantina (X) debido al catabolismo del ATP por otras enzimas; al mismo tiempo la enzima xantina deshidrogenasa (XDH) es transformada en xantina oxidasa (XO) por oxidación de los grupos sulfhidrilo (-SH), por una proteólisis limitada o por acción de proteasas dependientes de calcio (Reacciones 2 y 3) (Hermes-Lima et al., 1998; Halliwell y Gutteridge, 2007). Durante la reoxigenación, la XO cataliza la oxidación secuencial de

HX y X a ácido úrico, mientras reduce el O_2 y se produce O_2^- en el último paso de esta serie de reacciones (Reacciones 4 y 5) (Elsner, 1998; Hermes-Lima et al., 1998; Kevin et al., 2005; Valko et al., 2007).

Hipoxia:



Reoxigenación:



Para controlar los niveles de ERO y proteger a la célula de las condiciones de estrés oxidativo, los organismos han desarrollado una serie de respuestas, que incluyen: 1) mecanismos preventivos; 2) mecanismos reparadores; 3) defensas físicas y 4) defensas antioxidantes (Valko et al., 2007). Dentro de las defensas antioxidantes existen las enzimas que neutralizan las ERO (superóxido dismutasa y sus isoenzimas), enzimas encargadas de inactivar peróxidos (catalasa, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas), enzimas detoxificantes (glutatión S-transferasas) y una red de antioxidantes no enzimáticos (glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol, ácido úrico, etc.) (Nordberg y Arner, 2001; Blokhina et al., 2003; Valko et al., 2007).

Cada enzima antioxidante posee afinidad hacia una o varias ERO (Rodríguez-Perón et al., 2001). Entre las más conocidas están la superóxido dismutasa (SOD) que se encarga de catalizar la dismutación de 2 moléculas de O_2^- , para generar O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (McCord y Fridovich, 1969). En las células de mamíferos existen

tres isoenzimas de la SOD que difieren en localización y en el metal cofactor unido a su sitio activo. La SOD dependiente de cobre y zinc (SOD-CuZn) se encuentra en el citosol, mientras que la SOD dependiente de manganeso (SOD-Mn) se localiza en la mitocondria, también se ha reportado una SOD extracelular dependiente de cobre y zinc (SOD-EC) (Halliwell y Gutteridge, 2007; Hermes-Lima, 2004a; García-López et al., 2007). Las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) se encargan de degradar o remover al H_2O_2 . La CAT reacciona con dos moléculas de H_2O_2 para formar agua y O_2 molecular, usando una molécula de H_2O_2 como oxidante y la otra como reductora (Matés, 2000; Zamocky et al., 2008). La GPx cataliza la reducción de los hidroperóxidos y el H_2O_2 en una reacción que involucra glutatión (GSH). La glutatión S-transferasa (GST) se encarga de iniciar la destoxificación de compuestos xenobióticos catalizando la reacción de dichos compuestos con el grupo $-SH$ del GSH, neutralizando así sus sitios electrofílicos y generando productos más solubles en agua (Acworth y Bailey, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2007). Además, la GST neutraliza los compuestos formados por estrés oxidativo, y gracias a su modesta actividad de peroxidación, también ayuda a reducir los hidroperóxidos lipídicos que se forman durante la oxidación de membrana celular (Hayes et al., 2007) (Fig. 1).

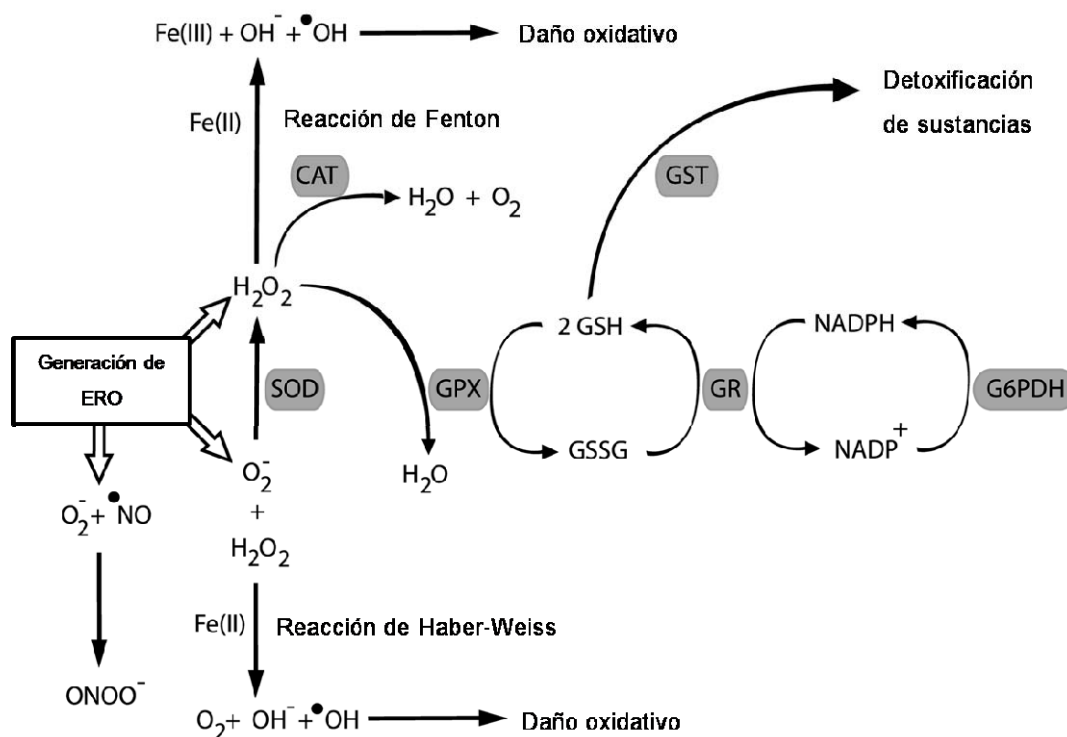


Figura 1. Metabolismo oxidativo. O_2 = oxígeno molecular, O_2^- = radical superóxido, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, OH^\cdot = radical hidroxilo, H_2O = agua, SOD = superóxido dismutasa, CAT = catalasa, GPX = glutación peroxidasa, GST = glutación S-transferasa, GR = glutación reductasa, GSSG = glutación disulfuro, GSH = glutación, G6PDH = glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH = dinucleótido de nicotinamida y adenina fosforilado reducido, $NADP^+$ = dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfatado, $\cdot NO$ = óxido nítrico, $ONOO^-$ = peroxinitrito (Tomado de Hermes-Lima, 2004a).

Uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes en los organismos es el GSH, un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) de bajo peso molecular que se sintetiza en la célula (Meister y Anderson, 1983; Anderson y Sies, 1996). Este tiol neutraliza el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el O_2 singulete (1O_2) y, debido a que generalmente se encuentra en elevadas concentraciones dentro de la célula, su tasa de neutralización de ERO es elevada (Willmore y Storey, 1997; Halliwell y Gutteridge, 2007). El GSH es convertido a su forma oxidada, glutación disulfuro (GSSG), por acción de la (GPx) que lo utiliza como cofactor para reducir peróxidos (Meister y Anderson, 1983; Hermes-Lima, 2004a). Sin embargo, la enzima GSSG reductasa (GR)

reacciona con el GSSG para regresarlo a su forma reducida (GSH) usando NADPH como cofactor (Anderson y Sies, 2006; Halliwell y Gutteridge, 2007) (Fig. 1). De manera natural la proporción de GSH/GSSG es de 10:1. Cuando las ERO están presentes en grandes cantidades, la formación de GSSG excede la capacidad reductora de GR y la proporción (GSH/GSSG) disminuye (Willmore y Storey, 1997; Rahman et al., 2006).

El papel de las moléculas antes mencionadas en la defensa antioxidante en organismos, ha sido objeto de numerosos estudios principalmente en el área de la medicina (Matés et al., 1999; Hermes-Lima, 2004; Valko et al., 2007). La oxidación de biomoléculas esenciales en la célula puede causar enfermedades tan importantes como Alzheimer, Parkinson, diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, entre muchas otras (Dalle-Donne et al., 2006b). Se han realizado diversos estudios que relacionan los indicadores de estrés oxidativo con enfermedades asociadas a la isquemia-reperfusión. Un estudio con cerebros de jerbos de Mongolia que fueron sometidos a periodos de isquemia-reperfusión, por oclusión de las arterias carótidas, mostraron un aumento en la oxidación proteica, así como una disminución en la actividad de la glutamina sintasa durante la perfusión, sin embargo la administración de un estabilizador de radicales libres (N-terbutil- α -fenilnitrona) 60 minutos antes de la isquemia, disminuye la oxidación a proteínas y previene la pérdida en la actividad de la glutamina sintasa (Oliver et al., 1990). También se han relacionado los ciclos de hipoxia-reoxigenación con el estrés oxidativo en placenta durante la preeclampsia, y se ha propuesto el uso de terapias a base de antioxidantes, como la vitamina C y E, para evitar esta patología entre las pacientes (Hung y Burton, 2006; Rumbold et al., 2008).

También se ha usado la medición de los antioxidantes y producción de ERO como marcadores de estrés oxidativo en organismos que habitan en condiciones extremas. Hermes-Lima y colaboradores (1993) midieron las defensas antioxidantes en serpientes liga, que son organismos que durante el invierno pueden congelarse por muchas horas y sufrir periodos de anoxia prolongados. Los autores encontraron que la actividad de las enzimas relacionadas con la remoción de hidroperóxidos como CAT y GPx fue mayor en músculo esquelético y pulmón, a lo que argumentan que las enzimas antioxidantes son una parte importante en el sistema de adaptación contra el congelamiento natural y la tolerancia a la anoxia en estos organismos (Hermes-Lima et al., 1993). También se han estudiado las defensas antioxidantes en organismos que se exponen a periodos de hipoxia, como gasterópodos y bivalvos marinos, tortuga japonesa y foca anillada (Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002).

Los odontocetos son organismos que también se exponen a periodos de isquemia ya que realizan buceos a profundidades máximas de entre 70 y 2000 metros dependiendo de la especie (Jefferson et al., 1993; Noren y Williams, 2000) y por tiempos máximos que van desde 8 minutos, en el caso del delfín común (*Delphinus delphis*) (Stewart, 2002) hasta los 75 minutos, por parte del cachalote (*Physeter macrocephalus*) (Noren y Williams, 2000; Kooyman, 2002). Sin embargo, se han reconocido a las 3 especies de cachalote (*P. macrocephalus*, *Kogia sima* y *K. breviceps*) como buceadores profundos (profundidades máximas de entre 1100 y 2000 metros) en comparación con la mayoría de las especies de delfines (profundidades de máximas de entre 260-700 metros) (Cardona-Maldonado y Mignucci-Giannoni, 1999; Stewart, 2002; Whitehead, 2002; Clarke, 2003; Beatson, 2007).

Diversos grupos de investigación han estudiado las capacidades de buceo, no sólo de odontocetos sino de mamíferos marinos en general y han discutido las adaptaciones fisiológicas y metabólicas de estos organismos (Hochachka y Storey, 1975; Kooyman et al., 1981; Williams et al., 1999a; Williams et al., 1999b; Skrovan et al., 1999). Recientemente se han comenzado a analizar las adaptaciones a nivel bioquímico y molecular relacionadas con la isquemia y la subsecuente reoxigenación que ocurren durante los buceos y la primera bocanada de aire en superficie (Elsner et al., 1998; Zenteno-Savín et al., 2002; Johnson et al., 2004 y 2005; Vázquez-Medina et al., 2007). Entre las adaptaciones que se han estudiado está el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, por sus siglas en inglés) encargado de la regulación de genes que ayudan al organismo que se encuentra en normoxia, a adaptarse y sobrevivir ante un periodo de hipoxia (Johnson et al., 2004 y 2005), así como los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y su capacidad para neutralizar ERO en organismos que suelen someterse a periodos de isquemia-reperfusión como las focas (Zenteno-Savín et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2006, 2007).

En 1998, Elsner y colaboradores realizaron un estudio en donde comparan la actividad de SOD en tejidos de corazón y riñón de foca anillada y cerdo común, así como la formación de HX en muestras de los mismos tejidos incubadas por 30 minutos en un contenedor de agua a 35° C, para representar una isquemia experimental. Encontraron que la producción de HX fue menor en corazón y riñón de foca que en los mismos tejidos de cerdo. Los autores discutieron que la mayor actividad de la SOD en el tejido cardíaco de foca podría ser el resultado de un precondicionamiento a la isquemia, dado por el flujo intermitente al que se ve sometido este órgano durante el buceo, con el fin de evitar una elevada producción de ERO durante la reperfusión.

Mientras que la menor formación de HX en focas habla de que estos organismos pueden conservar mejor las reservas de nucleótidos energéticos, principalmente ATP (Elsner et al., 1998).

Wilhem-Filho y colaboradores (2002) compararon la concentración de GSH, la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST, GPx y GR) y los productos formados por la peroxidación de lípidos de la membrana celular medido como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en sangre de 5 especies de mamíferos terrestres y 3 de buceadores, y encontraron que los mamíferos que bucean tienen una mayor actividad de las enzimas antioxidantes, mayores niveles de GSH, así como niveles más bajos de TBARS. Esto es debido a que los organismos que enfrentan cambios en la disponibilidad de O_2 tienen estrategias para prevenir el daño oxidativo, como presentar niveles elevados de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Wilhem-Filho et al., 2002).

Zenteno-Savín y colaboradores (2002) realizaron un estudio donde proponen a las focas como posible modelo para entender el estrés oxidativo ocasionado por buceo. Los autores midieron la capacidad antioxidante total (AOX), la producción de O_2^- y los niveles de TBARS en muestras de corazón, riñón y músculo de foca anillada y cerdo común, y tomaron pequeños cortes de cada muestra que fueron incubados para comparar la producción endógena de O_2^- . Los autores encontraron que en condiciones pro-oxidantes los tejidos de foca mostraron mayor producción de O_2^- que los tejidos de cerdo; sin embargo, los niveles de TBARS no se incrementaron proporcionalmente en el músculo de foca. Ellos proponen que estos resultados están relacionados a la AOX encontrada en ambas especies, siendo mayor en los tejidos de foca que en los de cerdo. Además de que explican que las diferencias observadas entre tejidos pueden ser debidas

a la función específica de cada uno, a la capacidad antioxidante o a las diferencias en la vasoconstricción de los tejidos, sobre todo en foca (Zenteno-Savín et al., 2002).

En un par de estudios, Vázquez-Medina y colaboradores (2006 y 2007) analizaron muestras de 5 tejidos de foca anillada y cerdo común (corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo). En ambas especies midieron la actividad de 4 enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GST y GPx) (Vázquez-Medina, 2006), así como las concentraciones de glutatión total (GSH-Eq = GSH + 2GSSG), GSH, GSSG y la proporción del GSSG con respecto al total (GSSG:GSH-Eq), la actividad de GR, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y los niveles de TBARS y carbonilos proteicos (Vázquez-Medina, 2007). Los autores encontraron que la actividad de SOD, GPx y GST fue mayor en corazón de foca que de cerdo, sugiriendo esto como una posible defensa contra la formación de ERO durante y después del buceo en este tejido (Vázquez-Medina et al., 2006). Los autores corroboran la idea de una mayor protección antioxidante en tejidos de focas cuando encuentran niveles más elevados de GSH-Eq, GSH, GSSG y mayor actividad de GR y G6PDH, así como menores niveles de TBARS y carbonilos proteicos en tejidos de foca que de cerdo (Vázquez-Medina et al., 2007).

Aunado a lo anterior, el laboratorio del Dr. Marc Mangel en la Universidad de California en Santa Cruz, CA, E.U.A., ha desarrollado un modelo matemático para predecir el estrés oxidativo en fócidos durante el buceo. En el laboratorio se trabajó con la información de los indicadores de estrés oxidativo obtenidos a partir de tejidos de foca anillada y cerdo común (Vázquez-Medina et al., 2006 y 2007). Los autores asumieron que durante un buceo el O₂ en los tejidos de foca disminuye de acuerdo a la profundidad y duración de la inmersión, y que una vez que es reintroducido al organismo después del buceo, éste sigue una dinámica trifásica pagando la deuda de

ácido láctico en primer lugar (donde la velocidad de saturación es baja), después cuando la mayoría de los tejidos son saturados (donde la velocidad es mayor), y por último cuando se llenan los almacenes de los capilares más pequeños (donde la velocidad es menor que en la segunda etapa, pero mayor que en la primera). Las premisas de este trabajo son que un exceso en la producción de O_2^- provoca daño oxidativo, que los antioxidantes actúan sobre las ERO minimizando el daño oxidativo, y que sin embargo, en ciertas condiciones en donde el organismo se encuentre enfermo, los antioxidantes en concentraciones elevadas pueden actuar como prooxidantes (Mangel coms. pers., 2008).

2. Justificación

Durante años se ha utilizado la información de los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos aunada con la producción de ERO y el daño causado por las mismas para el estudio de diversas enfermedades en humanos (Kevin et al., 2005; Dalle-Donne et al., 2006b; Karihtala y Soini, 2007; Valko et al., 2007), así como para conocer las adaptaciones de diversos organismos ante circunstancias extremas que inducen al estrés oxidativo (Hermes-Lima y Storey, 1993; Lushchak et al., 2001; Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002). Hasta ahora se sabe que cuando los animales se recuperan de un período de isquemia/reperfusión hay una alteración en la producción de ERO, de la misma manera que cambia la producción y actividad de los antioxidantes encargados de eliminarlas. Se sabe también a partir de los estudios en focas, que los organismos que bucean tienen mayor capacidad de neutralizar ERO después de ciclos de isquemia/reperfusión en comparación con sus contrapartes terrestres. Sin embargo, aún no se cuenta con suficiente información acerca de este tema en odontocetos, los que

por sus características fisiológicas también representan excelentes modelos de adaptación al buceo. Por otro lado, tampoco se han analizado diferencias entre buceadores someros contra buceadores profundos. La relación entre los ciclos de isquemia/reperfusión y el estado de estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiada en el ámbito de la biomedicina debido al daño que puede causar, particularmente en tejido cardiaco, en vasos sanguíneos y en tejido cerebral. Es por esto que el estudio de los indicadores de estrés oxidativo en organismos adaptados a constantes ciclos de isquemia/reperfusión ayudará a comprender mejor el papel de las enzimas encargadas de proteger al organismos contra una excesiva producción de ERO durante la reperfusión.

3. Hipótesis

Los niveles de ERO y las defensas antioxidantes de los organismos que están expuestos a ciclos de isquemia/reperfusión varían en relación a la especie y a las adaptaciones fisiológicas de la misma. Por lo tanto, se espera encontrar mayor actividad de las defensas antioxidantes en organismos activos, que realizan buceos cortos y someros, y que por lo tanto se exponen a ciclos cortos de isquemia-reperfusión (delfines) en comparación con organismos que realizan buceos largos y profundos, y que se someten a largos periodos de isquemia (kogias).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Comparar los indicadores de estrés oxidativo en tejidos de 6 especies de odontocetos con el fin de encontrar relaciones entre la producción de ERO, la actividad de los antioxidantes, el daño oxidativo y las estrategias de buceo de las diferentes especies analizadas.

4.2. Objetivos particulares

Medir la tasa de producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en tejidos (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo lateral dorsal y pectoral) de 6 especies de odontocetos para determinar la producción de ERO.

Medir los niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) y la concentración de carbonilos proteicos, como indicadores de daño oxidativo en tejidos (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo lateral dorsal y pectoral) de 6 especies de odontocetos.

Medir la actividad enzimática de SOD, SOD-Mn, SOD-CuZn, CAT, GST, GPx y GR en tejidos (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo lateral dorsal y pectoral) de 6 especies de odontocetos.

Medir la concentración de GSH y GSSG y GSH-Eq y la proporción de GSSG en el GSH-Eq en tejidos (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo lateral dorsal y pectoral) de 6 especies de odontocetos.

Comparar los resultados obtenidos entre los tejidos de las 6 especies de odontocetos analizadas.

Relacionar los resultados obtenidos entre las 6 especies de odontocetos, con la alimentación, la actividad y las capacidades de buceo (tiempo y profundidad máximos).

5. Material y métodos

5.1 Obtención de las muestras

Se obtuvieron muestras de músculo (pectoral y lateral dorsal), hígado, cerebro, riñón, corazón y pulmón de organismos varados de delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), delfín común de rostro corto (*Delphinus delphis*), delfín común de rostro largo (*Delphinus capensis*), delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), cachalote pigmeo (*Kogia breviceps*) y cachalote enano (*Kogia sima*). Se tomaron las muestras de organismos varados frescos (no más de 5 horas de muertos) y se colocaron en hieleras hasta su transporte al laboratorio, donde se colocaron en un ultracongelador a -80° C. Las muestras fueron colectadas en la comunidad de López Mateos Baja California Sur, México y en Carolina del Norte, Estados Unidos de América, con la colaboración de la familia De la Toba y el personal de campo de la NOAA, respectivamente. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado

5.2 Análisis bioquímicos

5.2.1 Producción de radical superóxido

Para determinar la producción de ERO se midió la tasa de producción endógena del $O_2^{\cdot -}$ a través de la reducción de ferricitocromo c a ferrocitocromo c durante un intervalo de tiempo fijo (Reacción 6) (Market et al., 1984; Drossos et al., 1995).



Se prepararon las muestras por triplicado colocando en tubos de ensaye 25 mg de tejido y solución amortiguadora de Krebs (NaCl 0.11 M, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 12 mM, NaH₂PO₄ 12 mM, NaHCO₃ 25 mM, y glucosa 1 mM). A cada tubo se le adicionó citocromo c (15 μM); se taparon los tubos y se incubaron durante 15 minutos en un baño de agua con agitación a 37° C, después se retiraron del baño y se les adicionó solución de N-etilmaleimida (3 mM) para detener la reducción. Se centrifugaron los tubos a 1509xg y a 4° C durante 10 minutos. Se leyó el sobrenadante a 550 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis, Princeton, NJ, EUA.) calibrado al aire. Al precipitado se le adicionó solución amortiguadora de Krebs, N-etilmaleimida y citocromo c. Se taparon los tubos, se agitaron y se incubaron durante 15 minutos en un baño de agua con agitación a 37° C. Posteriormente, se centrifugaron a 1509xg y a 4° C durante 10 minutos y se volvió a leer el sobrenadante a 550 nm; esta segunda lectura se consideró como el blanco de la muestra. Los resultados fueron expresados en nanomoles de O₂⁻ por minuto por miligramo de proteína.

5.2.2. Daño oxidativo

5.2.2.1. Peroxidación de lípidos

Para evaluar los niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) se midió la concentración de malondialdehído (MDA) formado cuando los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos resultantes de la peroxidación de los lípidos de la membrana celular reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA es un pigmento rosa cristalino cuya absorción máxima se registra a 532-535 nm (Persky et al., 2000).

Se preparó una curva estándar con solución de 1, 1, 2, 3-tetraetoxipropano (TEP) en un rango de 0 a 5 nmoles/250 μL. Se homogenizaron 100 mg de tejido en 2 mL de

solución para homogenizar (50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM) y fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF, 1 mM). Se tomaron 250 μ L del homogenizado y se colocaron en tubos Eppendorf®. Las muestras y la curva estándar fueron incubadas en un baño de agua a 37° C con agitación constante durante 15 minutos. Al terminar se les adicionó ácido tricloroacético (TCA 0.76 M, HCl 1M) para detener la reacción. Se añadió TBA al 1% y se incubaron los tubos a 90° C durante 10 minutos en un baño de agua con agitación constante. Posteriormente, se colocaron en un baño de hielo y se centrifugaron durante 15 minutos a 1509xg. Se recuperó el sobrenadante y se leyó a 542 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis, Princeton, NJ, EUA.). Los resultados se calcularon a partir de la curva estándar y se expresaron en nanomoles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por miligramo de proteína.

5.2.2.2. Carbonilos proteicos

Para la cuantificación de los carbonilos proteicos, las muestras se derivatizaron con 2,4-dinitrofenil hidracina (DNPH), y se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA), midiendo la absorbancia máxima entre 340 y 410 nm (Levine et al., 1990; Stadtman y Levine, 2000).

Se homogenizaron 100 mg de tejido en 2 mL de ácido sulfosalicílico 5% y se dividió el volumen homogenizado en 4 alícuotas iguales que fueron colocadas en tubos Eppendorf® y centrifugadas durante 5 minutos a 17005xg a 4° C. Se desechó el sobrenadante y a 2 de los tubos se les agregó DNPH (10 mM, para usarlos como muestra), y a los otros 2 se les agregó HCl (2 M, para usarlos como blanco). Se agitaron los tubos en un vórtex durante 40 segundos y se dejaron incubar por 1 hora a temperatura ambiente agitando durante 40 segundos cada 15 minutos. Se adicionó TCA

(20%) a cada tubo y los tubos se centrifugaron por 5 minutos a 17005xg a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol:acetato de etilo (1:1). Se centrifugaron los tubos por 5 minutos a 17005xg a temperatura ambiente y se repitió el procedimiento 3 veces. Posteriormente, se adicionó cloruro de guanidina (6 M) a cada tubo y se agitaron los tubos en el vórtex para incubarlos en un baño de agua a 37° C durante 15 minutos. Se centrifugaron los tubos a 17005xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se midió en un espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis, Princeton, NJ, EUA.) haciendo un barrido entre 340 y 410 nm y se anotó la absorbancia máxima. Los resultados se expresan en μ moles de carbonilos proteicos por gramo de tejido.

5.2.3. Actividad de enzimas antioxidantes

Previo al análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes, se tomaron 100 mg de tejido y se homogenizaron con 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM) y fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF, 1 mM). Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 1509xg y se recuperó el sobrenadante (Hermes-Lima *et al.*, 1998). Todos los homogenizados fueron utilizados inmediatamente para el análisis de actividad enzimática.

5.2.3.1. Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

Para medir la actividad de la SOD con sus isoformas (SOD-Mn y SOD-CuZn) se utilizó el sistema X/XO como generador constante de O_2^- , el cual al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y produce formazán cuyo cambio puede

ser detectado a 560 nm, la SOD se encarga de inhibir la reducción del NBT (Suzuki, 2000).

En una celda de plástico se adicionó y se mezcló solución de trabajo (solución amortiguadora sodio-carbonato 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1 mM), XO (1 U/mL en sulfato de amonio 2 M) y el sobrenadante de la muestra o blanco (solución para homogenizar 50 mM, pH 7.5, solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, EDTA 60 mM). Para la medición de la SOD-Mn, se dejó incubar un celda con solución de trabajo, solución de cianuro de sodio (0.25 M) y sobrenadante de la muestras o blanco por 10 minutos, y posteriormente se agregó XO (1 U/mL en sulfato de amonio 2 M). Para ambos casos se registró el cambio en la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis, Fullerton, CA, EUA.), durante 5 minutos cada 30 segundos. Se midió la actividad de la SOD y la SOD-Mn calculando el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT. La SOD-CuZn se obtiene de la diferencia de las actividades de SOD (total) y SOD-Mn. Los datos se expresan en unidades de actividad de SOD, SOD-Mn y SOD-CuZn por mg de proteína. Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la reacción de O_2^- con el NBT.

5.2.3.2. Catalasa (EC 1.11.1.6)

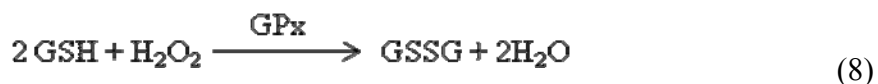
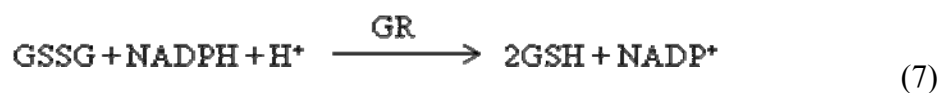
Para medir la actividad de catalasa se midió el decremento en la concentración de H_2O_2 en la muestra a 240 nm, partiendo de la premisa que el H_2O_2 es sustrato de la catalasa (Aebi, 1984).

En una celda de cuarzo se agregaron 1.5 mL de solución de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, solución stock de H_2O_2 20 mM) y 10 μ L del

sobrenadante de la muestra, previamente homogenizado y centrifugado. Para la solución de trabajo se utilizó una concentración de H₂O₂ de 0.45 a 0.5 milimol/L. Se leyó la muestra a 240 nm en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis, Fullerton, CA, EUA), cada 5 segundos durante 3 minutos. Los resultados se expresan en unidades de CAT por miligramo de proteína. Una unidad de actividad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para consumir un μmol de H₂O₂ por minuto.

5.2.3.3. Glutación peroxidasa (EC 1.11.1.9)

La actividad de la GPx se midió indirectamente monitoreando el decremento continuo de NADPH. GPx cataliza la reacción de H₂O₂ con glutación reducido (Reacciones 7 y 8) (Flohé y Günzler, 1984).



En una celda de plástico se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), azida de sodio (20 mM), GR (15 U/mL), NADPH (1.5 mM), GSH (250 mM), homogenizado previamente preparado y agua desionizada fría, para leerlos a 340 nm por 40 segundos cada 3 segundos en un espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis, Princeton, NJ, EUA.). El resultado de la lectura fue tomado como primer blanco. A la celda previamente leída se le agregó H₂O₂ (10 mM) y se volvió a leer a 340 nm por 40 segundos cada 3 segundos. El resultado de esta segunda lectura fue tomado como muestra. En otra celda de plástico se agregaron todas las

soluciones del primer blanco y la muestra, con excepción de la muestra y 550 μL de agua, se leyó a 340 nm por 40 segundos cada 3 segundos. El resultado de esta lectura fue tomada como segundo blanco. Se realizaron los cálculos y los resultados fueron expresados en unidades de GPx por miligramo de proteína. Una unidad de GPx es la cantidad de enzima necesaria para convertir H_2O_2 y GSH en GSSG.

5.2.3.4. Glutación-S-transferasa (EC 2.5.1.18)

Para medir la actividad de la GST se utilizó la aparición del complejo tioéter glutatión dinitrobenzoylo y ácido clorhídrico (HCl) cuando se conjuga glutatión reducido (GSH) con 1-cloro 2,4-dinitrobenzoylo (CDNB), la cual es una reacción catalizada por GST (Reacción 9) (Habig y Jakoby, 1981).



(9)

En una celda de plástico se mezclaron solución de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, GSH 1 mM, EDTA 0.5 mM), solución de sustrato (CDNB, 10 mM) y muestra, y se leyó a 340 nm durante 6 minutos cada 30 segundos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis, Fullerton, CA, EUA.). Para medir el blanco se mezcló solución de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, GSH 1 mM, EDTA 0.5 mM) y solución de sustrato (CDNB, 10 mM) en una celda de plástico y se leyó a 340 nm durante 6 minutos. La actividad enzimática se expresó en unidades de GST por miligramo de proteína. Una unidad de actividad de GST se define

como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1 μmol de CNDB por minuto a 25° C.

5.2.3.5. Glutación disulfuro reductasa (EC 1.6.4.2)

La actividad catalítica de GR se mide siguiendo el decremento en la absorbancia durante la oxidación del NADPH (Reacción 7) (Goldberg y Spooner, 1987).

En una celda de plástico se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), NADPH (2 mM), homogenizado previamente preparado y agua desionizada fría, para leerlos a 340 nm por 40 segundos cada 3 segundos en un espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis, Princeton, NJ, EUA.). Esta primera medida se consideró como primer blanco. Posteriormente a la mezcla se le agregó GSSG (10 mM) y se leyó a 340 nm por 40 segundos cada 3 segundos, la medida a partir de esta segunda lectura se tomó como la muestra. En otra celda de plástico se agregaron y se mezclaron las mismas soluciones, con excepción del homogenizado de la muestra, y 690 μL de agua, se leyó a 340 nm por 40 segundos cada 3 segundos y se tomó como segundo blanco. Los resultados fueron expresados en unidades de GR por miligramo de proteína. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmol de GSSG por minuto.

5.2.4. Glutación y glutación disulfuro

El ensayo se basa en la reacción de glutación reducido (GSH) con ácido 5,'5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman), el producto de esta reacción es de coloración amarilla y puede detectarse en un espectrofotómetro a 412 nm.

Se homogenizaron las muestras 1:10 (peso/volumen) en ácido sulfosalicílico (5%) previamente burbujeado durante 10 minutos con gas N₂ y una vez homogenizadas se burbujearon durante 10 segundos en el mismo gas. Se centrifugaron a 17005xg a 4° C durante 5 minutos. Se desechó el precipitado y se recuperó el sobrenadante el cual se almacenó en tubos Eppendorf® que fueron colocados sobre hielo. Para determinar la concentración de GSH-Eq (GSSH + 2GSH) se mezcló en una celda de plástico H₂O, solución de GSH (0-8 µM) (ácido sulfosalicílico 5%, H₂O, solución de GSH 2 mM), NADPH (0.3 mM, en solución amortiguadora de fosfatos 125 mM, KPi 125 mM), solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, EDTA 6 mM), DTNB (6 mM, en KPi 125 mM) y GR (50 U/mL, en KPi 125 mM). Se leyó la celda a 412 nm y se registró el cambio en la absorbancia durante 130 segundos y se calculó la concentración de GSH-Eq utilizando una curva estándar. Para la medición de GSSG, se tomó homogenizado, se agregó KPi 500 mM (pH 7.0) y se ajustó el pH entre 5.5 y 7.5 con NaOH (1 mM). A la mezcla anterior se le agregó de 2-vinil piridina (VP2) (0.5 M, en etanol) y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, en una celda se agregó la mezcla incubada, solución de GSSG (KPi 500 mM, ácido sulfosalicílico 5%, solución de GSSG 2 mM), NADPH (0.3 mM, en KPi 125 mM), DTNB (6 mM, en KPi 125 mM) y GR (50 U/mL, en KPi 125 mM). Se leyó la celda a 412 nm y se registró el cambio en la absorbancia durante 130 segundos y se calculó la concentración de GSSG utilizando una curva estándar. La concentración de GSH-Eq y GSSG se determinan comparando la tasa de formación del producto coloreado en la curva estándar. La proporción GSSG:GSH-Eq se obtuvo dividiendo los valores de GSSG entre los de GSH-Eq. Para la obtención del GSH se restó el valor de GSSG multiplicado por 2 al valor de GSH-Eq,

los resultados fueron expresados en nanomoles de GSH-Eq, GSSG o GSH por gramo de tejido húmedo.

5.2.5. Proteínas solubles

Se calculó la concentración de proteínas solubles en los extractos tisulares para estandarizar los resultados de las actividades enzimáticas. Se utilizó el kit comercial de Bio-Rad (Laboratories Hercules, CA. E.U.A.), siguiendo el método descrito por Bradford (1976) adaptado a microplaca. Las muestras se diluyeron 1:100 con solución amortiguadora de fostafos (50 mM, pH 7.5; EDTA 1 mM). Se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (ASB) en un rango de concentraciones de 10 a 200 mg/mL. En una microplaca se agregaron a cada pozo 155 μ L de dH₂O, 45 μ L de colorante azul Coomassie® y 25 μ L de la curva estándar o la muestra. Se preparó un blanco con dH₂O y colorante Coomassie®. Después de 15 minutos, se leyó la absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas (MRX Revelation, Chantilly, VA, EUA.). Los datos se expresan en miligramos de proteína por mililitro. Los cálculos de la concentración de proteínas en cada muestra se hicieron con base en la regresión obtenida de la curva estándar.

5.3. Análisis estadísticos

A los resultados obtenidos de las pruebas de laboratorio se les aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff y el análisis de homogeneidad de varianzas de Barlett (Zar, 1999) para la estadística descriptiva. Como los datos no presentaron normalidad en todas las variables analizadas, se optó por normalizar los datos con la fórmula de logaritmo (Zar, 1999). Debido a los antecedentes en las capacidades de

buceo de las especies analizadas, se realizaron pruebas de ANOVA de una vía, donde la n permitió, para comparar las diferencias entre las especies de delfines, de la misma manera se compararon las 2 especies de kogias. No se encontraron diferencias entre las especies de delfines por lo que se pudieron agrupar como buceadores someros, al igual que las especies de kogias, las cuales se agruparon como buceadores profundos, quedando al final 2 grupos. Posteriormente, se utilizó ANOVA de una vía para comparar las diferencias entre grupos; para la comparación entre tejidos por grupo se utilizó un ANOVA con una prueba a posteriori de Tukey (Zar, 1999). El nivel de significancia utilizado fue $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando los paquetes SYSTAT[®] Ver 12.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, E.U.A.) y STATISTICA[®] Ver 7.0 (STATSOFT, San Diego, CA, E.U.A.).

6. Resultados

6.1. Diferencias entre tejidos

6.1.1. Delfines

6.1.1.1. Producción de radical superóxido

Los resultados de la producción de O_2^- en tejidos de delfines se muestran en la tabla I y en la figura 2. La producción de radical superóxido fue significativamente mayor en pulmón que en cerebro, corazón, riñón e hígado de delfines ($p = 0.0003$) (Tabla I, Fig. 2).

Tabla I. Producción de radical superóxido, niveles de TBARS y de carbonilos proteicos en tejidos de delfines ($n = 19$).

Tejidos	Radical superóxido (nmol/min * mg prot.)	TBARS (nmol/mg prot.)	Carbonilos proteicos (milimol/g de tejido húmedo)
Cerebro	0.00019 ± 0.00005^b	0.223 ± 0.084	50.004 ± 10.52^a
Corazón	0.00017 ± 0.00003^b	0.346 ± 0.075	118.6 ± 16.97^{bc}
Riñón	0.00029 ± 0.00008^b	0.333 ± 0.12	132.38 ± 13.16^{bc}
Lat. dorsal	0.00041 ± 0.00008^{ab}	0.342 ± 0.124	123.44 ± 28.8^c
Hígado	0.00021 ± 0.00005^b	0.241 ± 0.073	155.38 ± 17.72^{bc}
Pulmón	0.00062 ± 0.00013^a	0.274 ± 0.075	198.91 ± 22.42^b
Musc. pect.	0.00036 ± 0.00005^{ab}	0.256 ± 0.074	113.17 ± 19.86^{bc}

Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados están expresados como media \pm error estándar. Las letras distintas denotan diferencias significativas; $p < 0.05$.

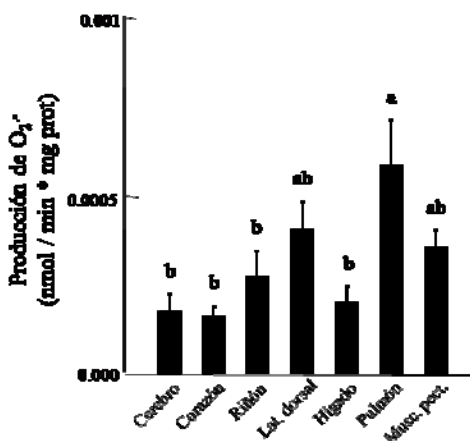


Figura 2. Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, nmol/min*mg proteína) en tejidos de delfines (n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tejido; $p < 0.05$.

6.1.1.2. Daño oxidativo. Niveles de TBARS y carbonilos proteicos

Los niveles de TBARS y de carbonilos proteicos en tejidos de delfines se muestran en la tabla I y en la figura 3. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de TBARS entre los tejidos de delfines ($p = 0.93$) (Tabla I, Fig. 3a). En cuanto a los niveles de carbonilos proteicos, éstos fueron significativamente menores en tejido de cerebro en comparación con el resto de los tejidos y el pulmón tuvo mayores niveles que el músculo lateral dorsal ($p = 0.00001$) (Tabla I, Fig. 3b).

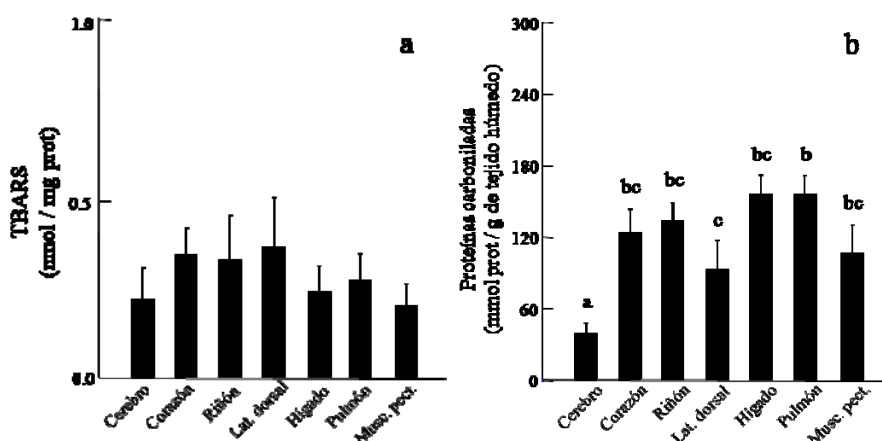


Figura 3. a) Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS, nmol/mg proteína) y b) de carbonilos proteicos (nmol de proteína/g de tejido húmedo), en tejidos de delfines (n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tejido; $p < 0.05$.

6.1.1.3. Actividad de las enzimas antioxidantes

No se encontraron diferencias significativas en las actividades de SOD total ni SOD-CuZn ($p = 0.21$ y $p = 0.29$, respectivamente) (Fig. 4a y c), pero si en la actividad de SOD-Mn, donde el cerebro presentó más actividad que el pulmón ($p = 0.027$) (Fig. 4b). Por otro lado, la actividad de CAT fue menor en cerebro, músculo lateral dorsal y pectoral, en comparación con corazón, riñón e hígado, mientras que en pulmón fue menor que en riñón e hígado ($p = 0.00001$) (Fig. 4d).

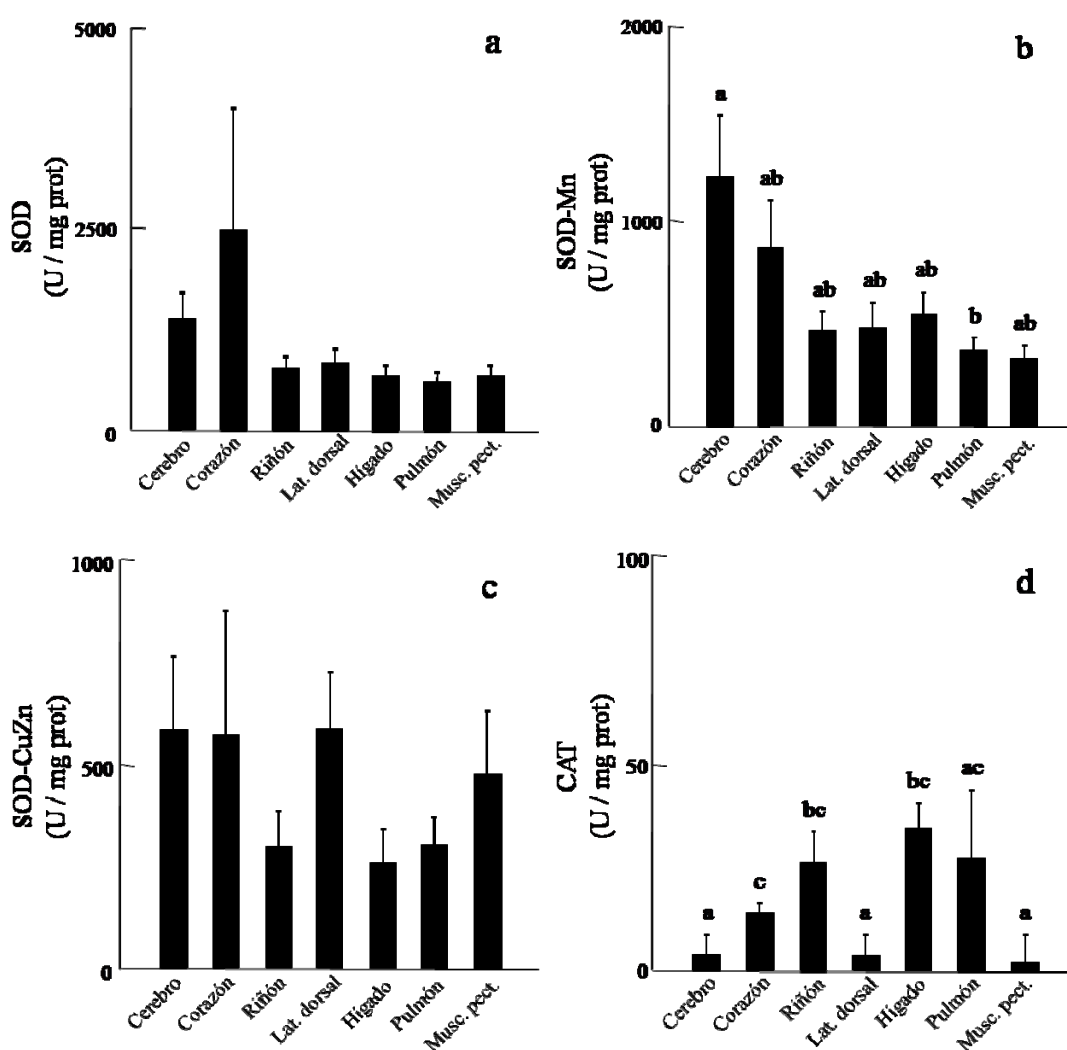


Figura 4. Actividad de las enzimas: a) superóxido dismutasa (SOD, unidades/mg proteína); b) superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn, unidades/mg proteína); c) superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (SOD-CuZn, unidades/mg proteína); d) catalasa (CAT, unidades/mg proteína) en tejidos de delfines ($n=19$). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Músc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tejido; $p < 0.05$.

La actividad de GST fue significativamente mayor en hígado que en cerebro, músculo lateral dorsal y pectoral, y pulmón de delfines ($p = 0.00005$) (Fig. 5a). La actividad de GPx fue mayor en riñón, hígado y pulmón que en músculo lateral dorsal ($p = 0.00001$) (Fig. 5b). La actividad de GR fue mayor en riñón, hígado y pulmón que en tejido cardíaco, mientras que riñón e hígado también presentaron mayores actividades de esta enzima que corazón, músculo lateral dorsal y pectoral de delfines ($p = 0.00001$) (Fig. 5c).

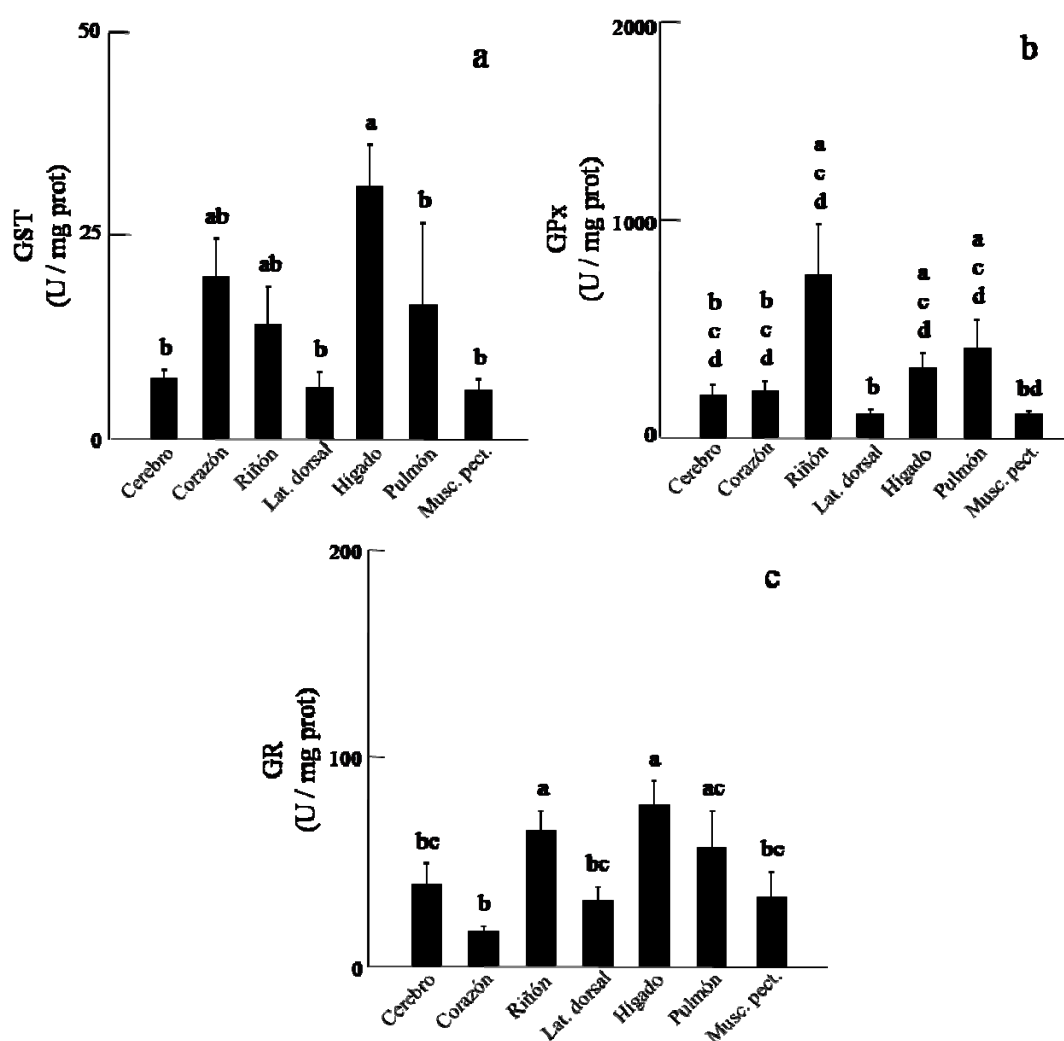


Figura 5. Actividad de las enzimas: a) glutatión S-transferasa (GST, unidades/mg proteína); b) glutatión peroxidasa (GPx, unidades/mg proteína) y c) glutatión reductasa (GR, unidades/mg proteína) en tejidos de delfines (n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos por tejido; $p < 0.05$.

6.1.1.4. Glutación y glutación disulfuro

Se encontró que los equivalentes de GSH (GSH-Eq) fueron significativamente mayores en corazón en comparación con cerebro, hígado, pulmón y riñón de delfines ($p = 0.0001$) (Fig. 6a). Los niveles de glutación oxidado (GSSG) fueron significativamente mayores en corazón que en el resto de los tejidos ($p = 0.00001$) (Fig. 6b). Por otro lado, la concentración de GSH fue mayor en corazón en comparación con cerebro, hígado, pulmón y riñón de delfín ($p = 0.001$) (Fig. 6c). La proporción GSSG:GSH-Eq no presentó diferencias significativas entre tejidos de delfines (Fig. 6d).

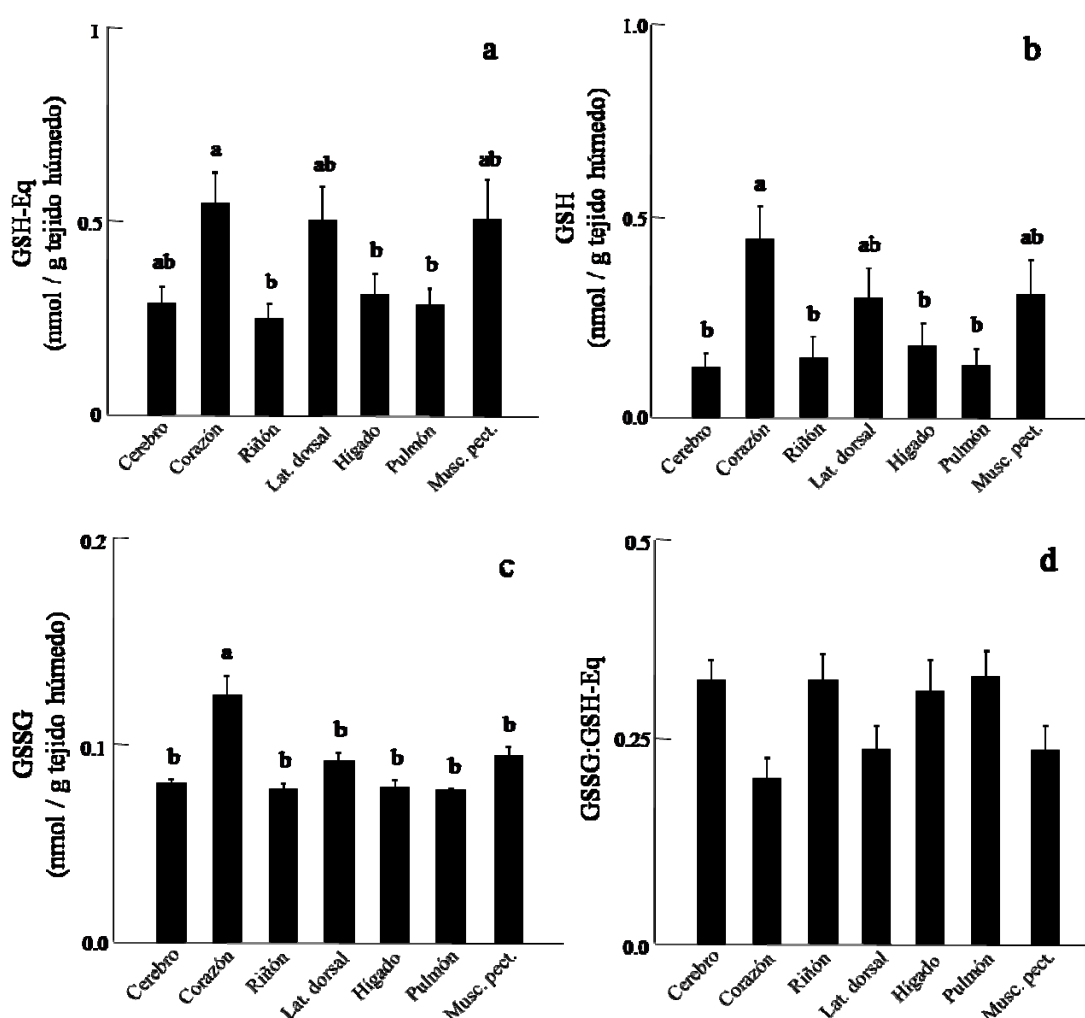


Figura 6. a) Contenido total de glutación (GSH-Eq, nmol/g de tejido húmedo); b) contenido de glutación reducido (GSH, nmol/g de tejido húmedo); c) contenido de glutación disulfuro (GSSG, nmol/g de tejido húmedo); y d) tasa de GSSG:GSH-Eq en tejidos de delfines ($n=19$). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos por tejido; $p < 0.05$.

6.1.1.5. Correlaciones por tejido

En cerebro de delfín se encontró una correlación negativa entre los niveles de carbonilos proteicos y la actividad de SOD y SOD-Mn ($R^2 = -0.91$ y $R^2 = -0.98$, respectivamente; $p < 0.05$). Así como una correlación negativa entre la producción de O_2^- y la actividad de CAT y los niveles de GSH-Eq y GSH ($R^2 = -0.96$, $R^2 = -0.91$ y $R^2 = -0.92$, respectivamente; $p < 0.05$).

En corazón se encontró una correlación positiva entre los niveles de TBARS y la actividad de SOD-Mn y GST ($R^2 = 0.92$ y $R^2 = 0.93$, respectivamente; $p < 0.05$). De la misma manera, una correlación positiva entre la actividad de CAT y los niveles de carbonilos proteicos ($R^2 = 0.87$; $p < 0.05$) en corazón de delfines.

En riñón se encontró una correlación positiva entre los niveles de TBARS y la actividad de SOD, así como las cantidades de GSSG y los niveles de carbonilos proteicos ($R^2 = 0.90$ y $R^2 = 0.88$, respectivamente; $p < 0.05$).

Se encontró una correlación positiva entre la actividad de CAT y los niveles de TBARS ($R^2 = 0.88$; $p < 0.05$) en músculo lateral dorsal.

En hígado se encontraron correlaciones negativas entre GR y las cantidades de GSH-Eq y GSH ($R^2 = -0.88$ y $R^2 = -0.86$, respectivamente; $p < 0.05$). De igual forma, se encontró una correlación negativa entre la actividad de GR y los niveles de TBARS ($R^2 = -0.90$; $p < 0.05$), y una correlación positiva entre los niveles de TBARS y las cantidades de GSH-Eq y GSH ($R^2 = 0.92$ y $R^2 = 0.86$, respectivamente; $p < 0.05$) en hígado de delfines.

En pulmón se encontró una correlación positiva entre la actividad de SOD-CuZn y los niveles de carbonilos proteicos ($R^2 = 0.73$; $p < 0.05$).

En músculo pectoral se encontraron correlaciones positivas entre los niveles de carbonilos proteicos y la actividad de SOD y SOD-CuZn ($R^2 = 0.92$ y $R^2 = 0.89$, respectivamente; $p < 0.05$); también se encontró una correlación positiva entre los niveles de TBARS y la actividad de GR ($R^2 = 0.89$; $p < 0.05$).

6.1.2. *Kogia* spp.

6.1.2.1. Producción de radical superóxido

Los resultados de la producción de $O_2^{\cdot -}$ en tejidos de *Kogia* spp. se muestran en la tabla II y en la figura 7.

La producción de $O_2^{\cdot -}$ fue significativamente mayor en hígado de *Kogia* spp. que en el resto de los tejidos con excepción de pulmón, mientras que éste último fue significativamente mayor en cerebro y en músculo lateral dorsal ($p = 0.00003$) (Tabla II, Fig. 7).

Tabla II. Producción de radical superóxido, niveles de TBARS y de carbonilos proteicos en tejidos de kogias (n = 11).

Tejidos	Radical superóxido (nmol/min * mg prot.)	TBARS (nmol/mg prot.)	Carbonilos proteicos (milimol/g de tejido húmedo)
Cerebro	0.00027 ± 0.00006 ^b	0.036 ± 0.024	68.65 ± 19.43 ^{bc}
Corazón	0.00052 ± 0.00014 ^{bc}	0.048 ± 0.025	99.62 ± 12.68 ^{ab}
Riñón	0.00059 ± 0.0001 ^{bc}	0.038 ± 0.01	126.18 ± 19.91 ^{ab}
Lat. dorsal	0.00053 ± 0.0001 ^b	0.007 ± 0.002	60.79 ± 13.09 ^b
Hígado	0.0014 ± 0.0002 ^a	0.028 ± 0.006	147.67 ± 20.1 ^{ac}
Pulmón	0.0013 ± 0.0003 ^{ac}	0.031 ± 0.005	209.26 ± 22.5 ^a
Musc. pect.	0.0006 ± 0.0001 ^{bc}	0.023 ± 0.011	82.55 ± 21.08 ^{bc}

Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados están expresados como media ± error estándar. Las letras distintas denotan diferencias significativas; $p < 0.05$.

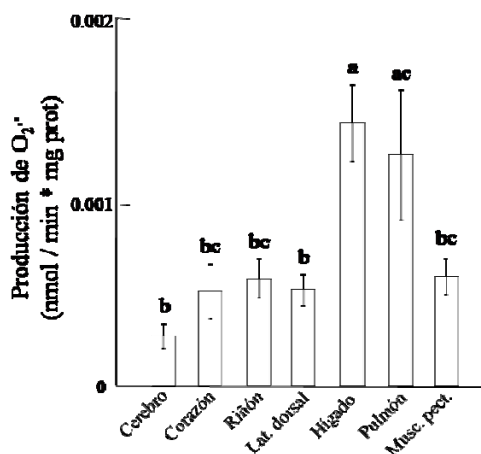


Figura 7. Producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$, nmol/min*mg proteína) en tejidos de kogias (n=11). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tejido; $p < 0.05$.

6.1.2.2. Daño oxidativo. Niveles de TBARS y carbonilos proteicos

Los niveles de TBARS y de carbonilos proteicos en tejidos de *Kogia* spp. se muestran en la tabla II y en la figura 8. Los niveles de TBARS no mostraron diferencias significativas entre tejidos ($p = 0.47$) (Tabla II, Fig. 8a), mientras que los niveles de carbonilos proteicos fueron significativamente mayores en pulmón en comparación con cerebro y ambos músculos, y en hígado comparado con músculo lateral dorsal ($p = 0.00003$) (Tabla II, Fig. 8b).

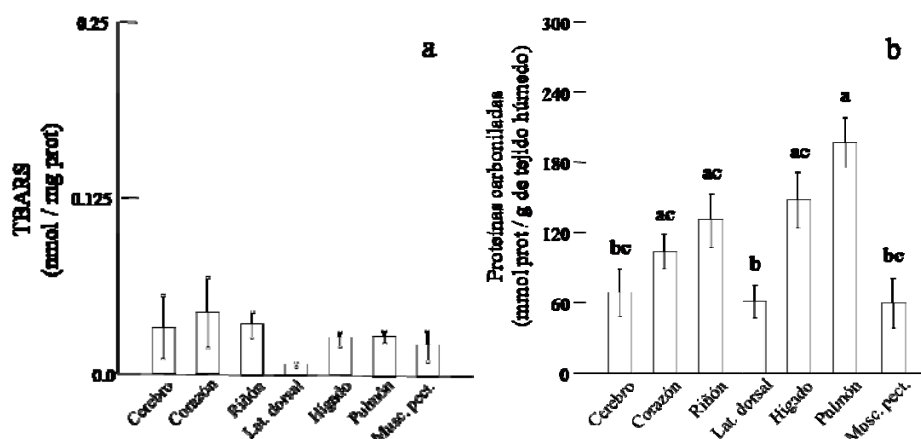


Figura 8. a) Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS, nmol/mg proteína) y b) de carbonilos proteicos (nmol de proteína/g de tejido húmedo), en tejidos de kogias (n=11). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tejido; $p < 0.05$.

6.1.2.3. Actividad de las enzimas antioxidantes

Las actividades de SOD y SOD-Mn fueron significativamente mayores en cerebro en comparación con hígado y pulmón ($p = 0.0041$ y 0.0072 , respectivamente) (Fig. 9a y b). La actividad de SOD-CuZn fue significativamente mayor en músculo lateral dorsal comparado con hígado y pulmón ($p = 0.004$) (Fig. 9c). La actividad de CAT fue significativamente mayor en hígado, corazón y riñón que en ambos tejidos musculares (lateral dorsal y pectoral); en hígado y riñón también hubo mayor actividad de CAT que en cerebro; hígado además presentó actividades significativamente mayores que en pulmón ($p = 0.00001$) (Fig. 9d).

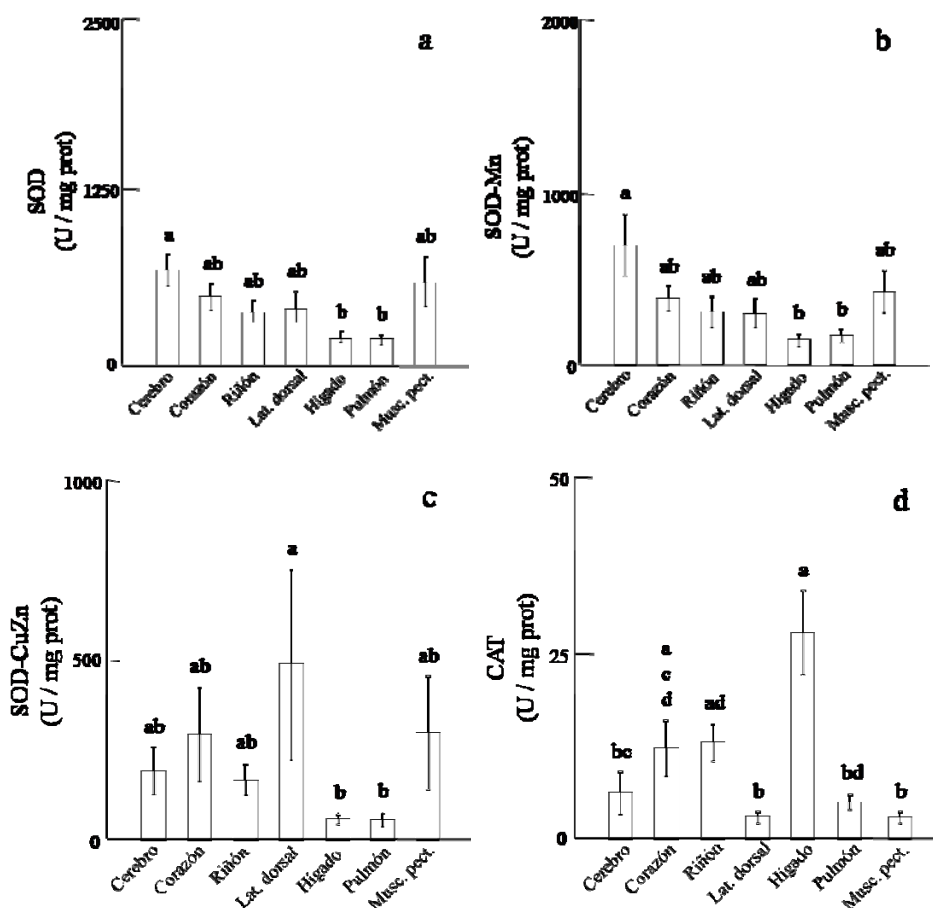


Figura 9. Actividad de las enzimas: a) superóxido dismutasa (SOD, unidades/mg proteína); b) superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn, unidades/mg proteína); c) superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (SOD-CuZn, unidades/mg proteína); d) catalasa (CAT, unidades/mg proteína) en tejidos de kogias ($n=11$). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre tejido; $p < 0.05$.

La actividad de GST fue significativamente mayor en el músculo lateral dorsal y pulmón en comparación con el hígado; en pulmón también hubo mayor actividad que en corazón ($p = 0.0008$) (Fig. 10a). GPx presentó actividades significativamente mayores en riñón y corazón que en músculo pectoral mientras que en riñón también hubo más actividad de GPx que en músculo lateral dorsal ($p = 0.003$) (Fig. 10b). La actividad de GR fue mayor en riñón que en corazón, músculo lateral dorsal, hígado y pulmón ($p = 0.002$) (Fig. 10c).

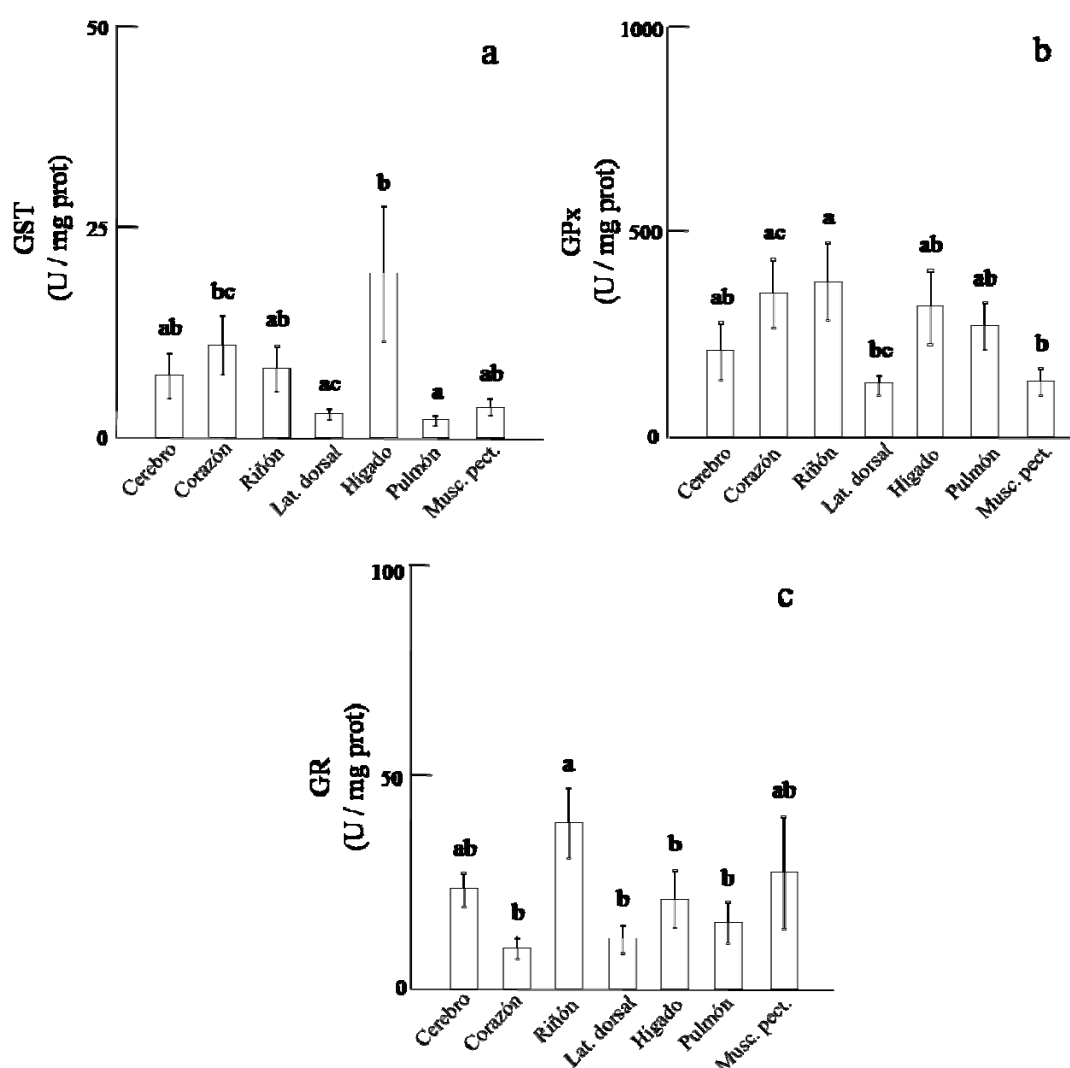


Figura 10. Actividad de las enzimas: a) glutatión S-transferasa (GST, unidades/mg proteína); b) glutatión peroxidasa (GPx, unidades/mg proteína) y c) glutatión reductasa (GR, unidades/mg proteína) en tejidos de kogias ($n=11$). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos por tejido; $p < 0.05$.

6.1.2.4. Glutación y glutatión disulfuro

Los GSH-Eq fueron significativamente mayores en riñón en comparación con corazón y músculo pectoral ($p = 0.0006$) (Fig. 11a). Las cantidades de GSSG fueron mayores en corazón y músculo lateral dorsal que en riñón, mientras que corazón también tuvo cantidades mayores de GSSG que cerebro y pulmón ($p = 0.00004$) (Fig. 11b). Los niveles de GSH fueron significativamente mayores en corazón que en riñón ($p = 0.03$) (Fig. 11c). Mientras que la proporción GSSG:GSH-Eq no mostró diferencias significativas entre tejidos ($p = 0.223$) (Fig. 11d).

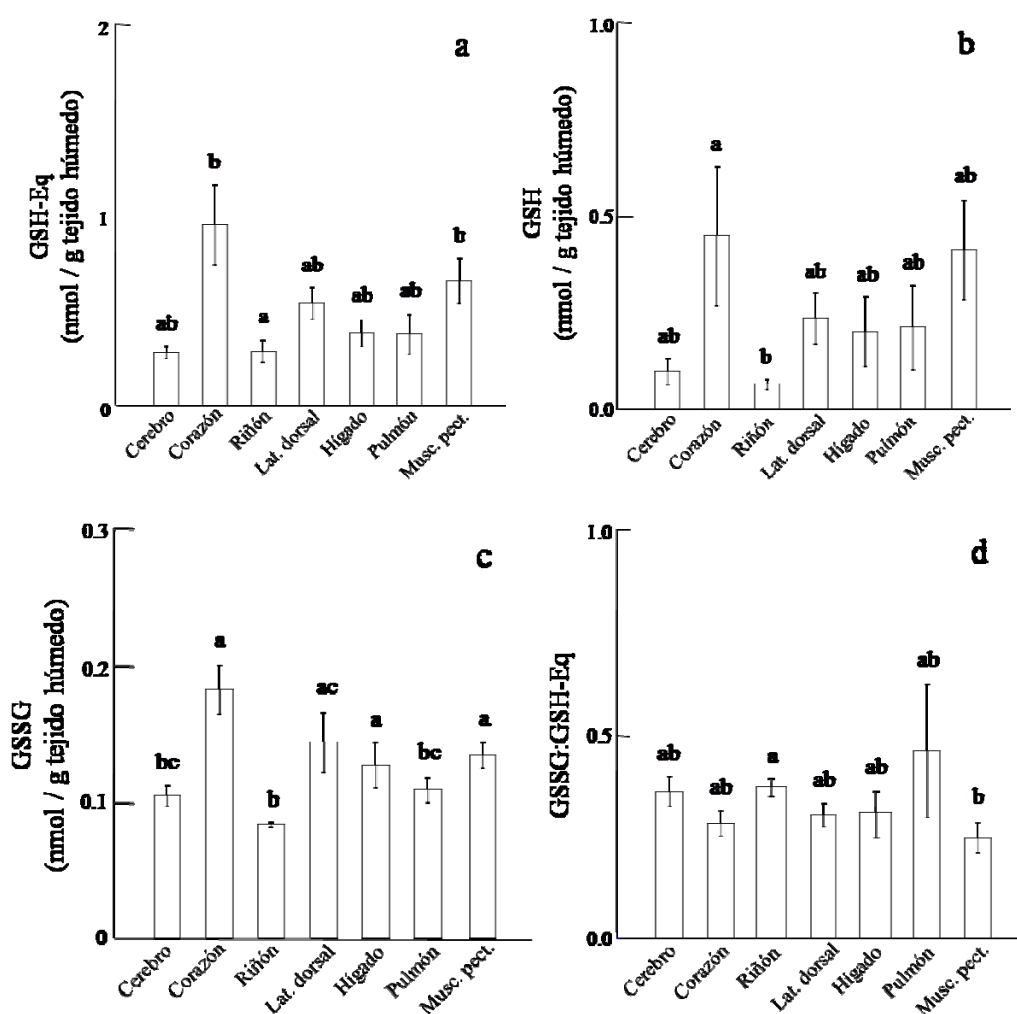


Figura 11. a) Contenido total de glutatión (GSH-Eq, nmol/g de tejido húmedo); b) contenido de glutatión reducido (GSH, nmol/g de tejido húmedo); c) contenido de glutatión disulfuro (GSSG, nmol/g de tejido húmedo); y d) tasa de GSSG:GSH-Eq en tejidos de kogia (n=11). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos por tejido; $p < 0.05$.

6.1.2.5. Correlaciones por tejido

En el cerebro de kogias se encontró una correlación negativa entre la actividad de GST y los niveles de TBARS, así como de la actividad de SOD con los niveles de carbonilos proteicos ($R^2 = -0.96$ y $R^2 = 0.81$, respectivamente; $p < 0.05$).

El corazón de kogias mostró una correlación positiva entre los niveles de TBARS y la actividad de CAT ($R^2 = 0.85$; $p < 0.05$).

En el riñón se encontró una correlación positiva entre la producción de O_2^- y la actividad de SOD-Mn y GPx ($R^2 = 0.87$ y $R^2 = 0.92$, respectivamente; $p < 0.05$).

El músculo lateral dorsal se encontró una correlación positiva entre la actividad de GR y la producción de O_2^- ($R^2 = 0.86$; $p < 0.05$).

En hígado de kogias se encontró una correlación positiva entre los niveles de TBARS y las cantidades de GSH-Eq y GSH ($R^2 = 0.83$ y $R^2 = 0.89$, respectivamente; $p < 0.05$). También se encontró una correlación positiva entre los niveles de GSH-Eq y los niveles de carbonilos proteicos ($R^2 = 0.88$; $p < 0.05$) en hígado de kogias.

En pulmón se encontró una correlación positiva entre los niveles de carbonilos proteicos y la actividad de SOD-CuZn y de GR ($R^2 = 0.71$ y $R^2 = 0.87$, respectivamente; $p < 0.05$).

En músculo pectoral se encontró una correlación positiva entre la producción de O_2^- y las actividades de SOD-CuZn, GST, GR y las cantidades de GSH ($R^2 = 0.93$, $R^2 = 0.88$, $R^2 = 0.96$ y $R^2 = 0.88$, respectivamente, $p < 0.05$). De igual forma los niveles de TBARS estuvieron correlacionados positivamente con las actividades de GST y GR ($R^2 = 0.89$ y $R^2 = 0.95$, respectivamente, $p < 0.05$) en músculo pectoral de kogias.

6.2. Delfines vs. Kogias

6.2.1. Producción de radical superóxido

La producción de O_2^- fue mayor en muestras de corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo pectoral de *Kogia spp.* en comparación con las de delfines ($p = 0.007$, $p = 0.027$, $p = 0.00001$, $p = 0.044$ y $p = 0.026$, respectivamente), mientras que en el resto de los tejidos no hubo diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$) (Fig. 12).

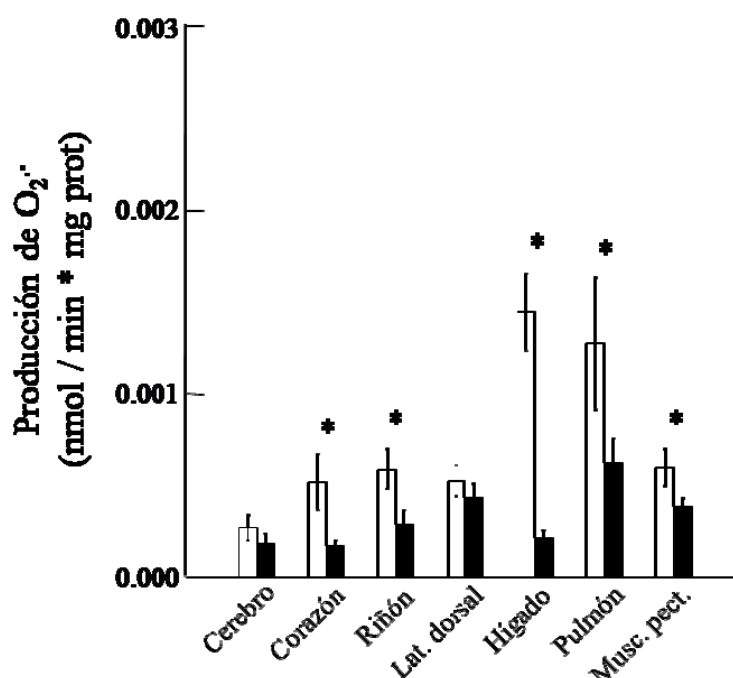


Figura 12. Producción de radical superóxido (O_2^- , nmol/min*mg proteína) en tejidos de kogias (\square n=11) y delfines (\blacksquare n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los * indican diferencias entre grupos; $p < 0.05$.

6.2.2. Daño oxidativo. Niveles de TBARS y carbonilos proteicos

Los niveles de TBARS fueron mayores en casi todos los tejidos de delfines, excepto en el cerebro, en comparación con los tejidos de *Kogia spp.* (corazón: $p = 0.002$, riñón: $p = 0.033$, lat. dorsal: $p = 0.008$, hígado: $p = 0.046$, pulmón: $p = 0.011$ y

muscul. pect.: $p = 0.005$) (Fig. 13a). No hubo diferencias significativas en los niveles de carbonilos proteicos entre delfines y kogias, en ninguno de los tejidos analizados ($p > 0.05$) (Fig. 13b).

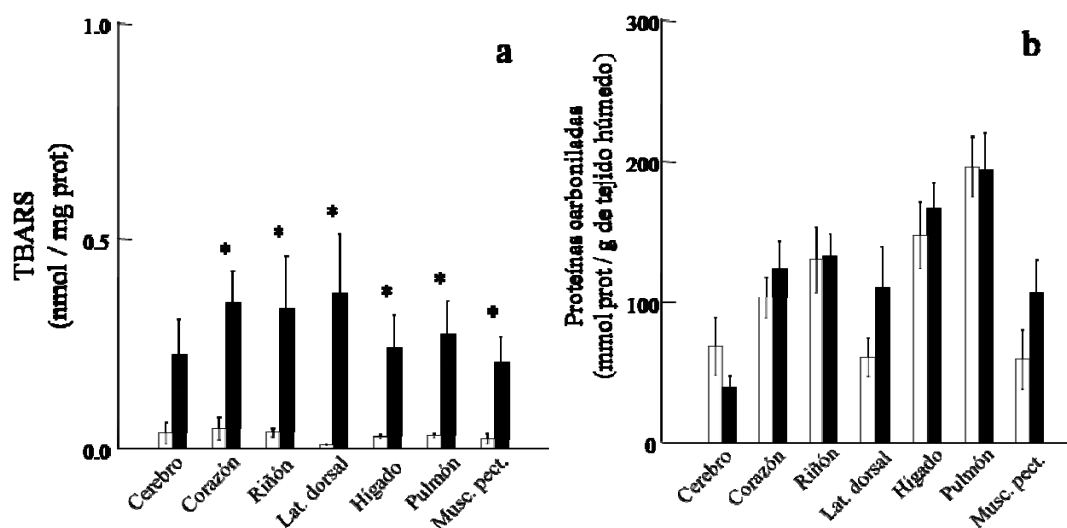


Figura 13. a) Niveles de peroxidación de lípidos (TBARS, nmol/mg proteína) y b) de carbonilos proteicos (milimol de proteína/gr de tejido), en tejidos de kogias (□ n=11) y delfines (■ n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los * indican diferencias significativas entre grupos; $p < 0.05$.

6.2.3. Actividad de las enzimas antioxidantes

La actividad de SOD fue mayor en riñón, hígado y pulmón de delfines en comparación con los mismos tejidos de *Kogia spp.* ($p = 0.019$, $p = 0.002$ y $p = 0.0001$, respectivamente) (Fig. 14a). La actividad de la SOD-Mn fue significativamente mayor en corazón e hígado de delfín que de kogia, el resto de los tejidos no presentaron diferencias significativas ($p = 0.046$ y $p = 0.03$, respectivamente) (Fig. 14b). La actividad de SOD-CuZn fue mayor en cerebro, hígado y pulmón, en el grupo de los delfines que en las kogias, mientras que en el resto de los tejidos no hubo diferencias significativas entre grupos ($p = 0.02$, $p = 0.02$, $p = 0.00001$, respectivamente) (Fig. 14c).

La actividad de CAT no presentó diferencias significativas entre grupos en ninguno de los tejidos analizados ($p > 0.05$) (Fig. 14d).

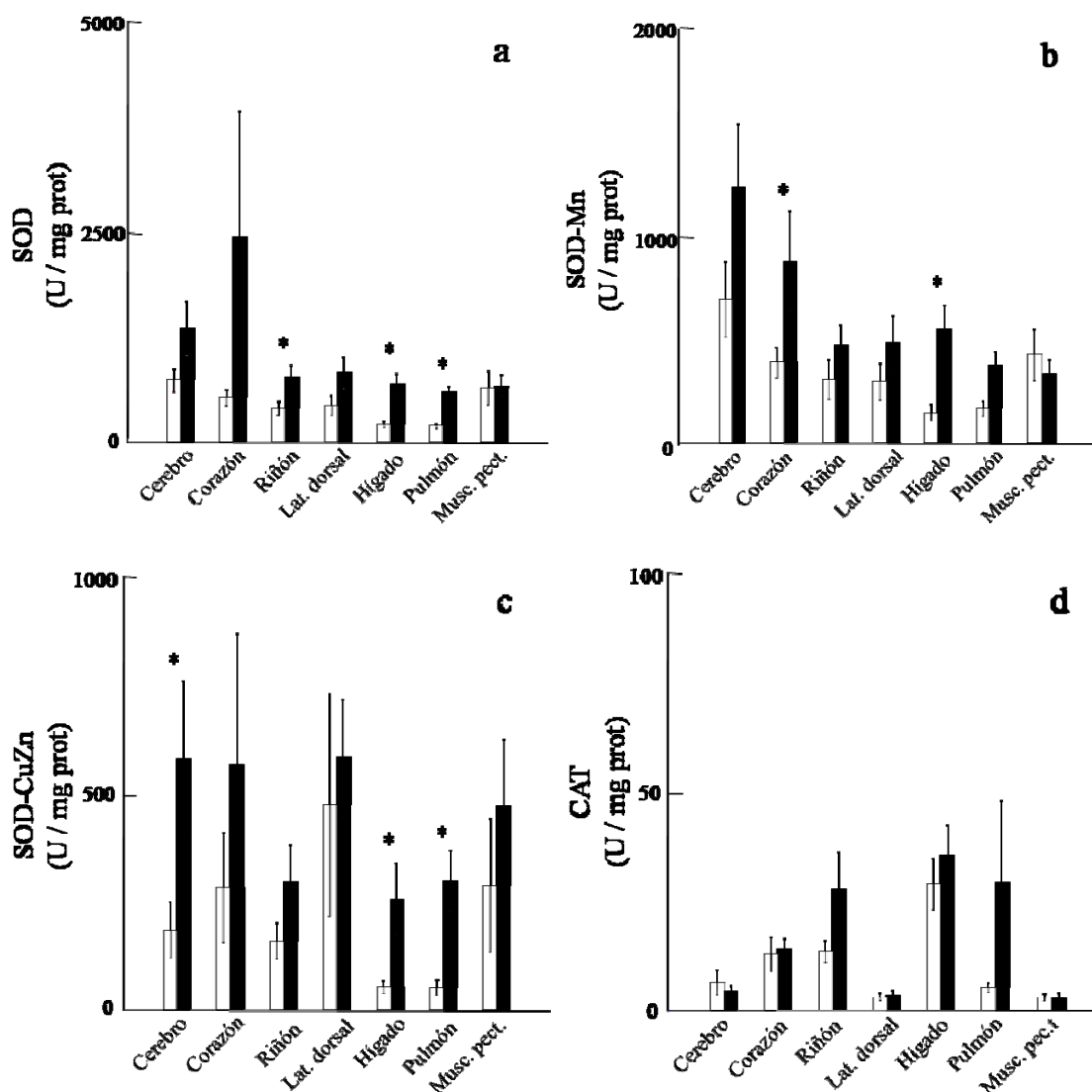


Figura 14. Actividad de las enzimas: a) superóxido dismutasa (SOD, unidades/mg proteína); b) superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn, unidades/mg proteína); c) superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (SOD-CuZn, unidades/mg proteína); d) catalasa (CAT, unidades/mg proteína) en tejidos de kogias (□ n=11) y delfines (■ n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los * indican diferencias significativas entre grupos; $p < 0.05$.

La actividad de GST no fue significativamente diferente entre delfines y kogias ($p > 0.05$) (Fig. 15a). GPx presentó mayor actividad en riñón de delfines que en el de *Kogia spp.*, mientras que el resto de los tejidos no presentó diferencias significativas

entre ambos grupos ($p = 0.044$) (Fig. 15b). GR fue mayor en cerebro, corazón, riñón, músculo lateral dorsal, hígado y pulmón de delfines que en los mismos tejidos de kogias ($p = 0.05$, $p = 0.005$, $p = 0.003$, $p = 0.00001$, $p = 0.00001$ y $p = 0.00001$, respectivamente) (Fig. 15c).

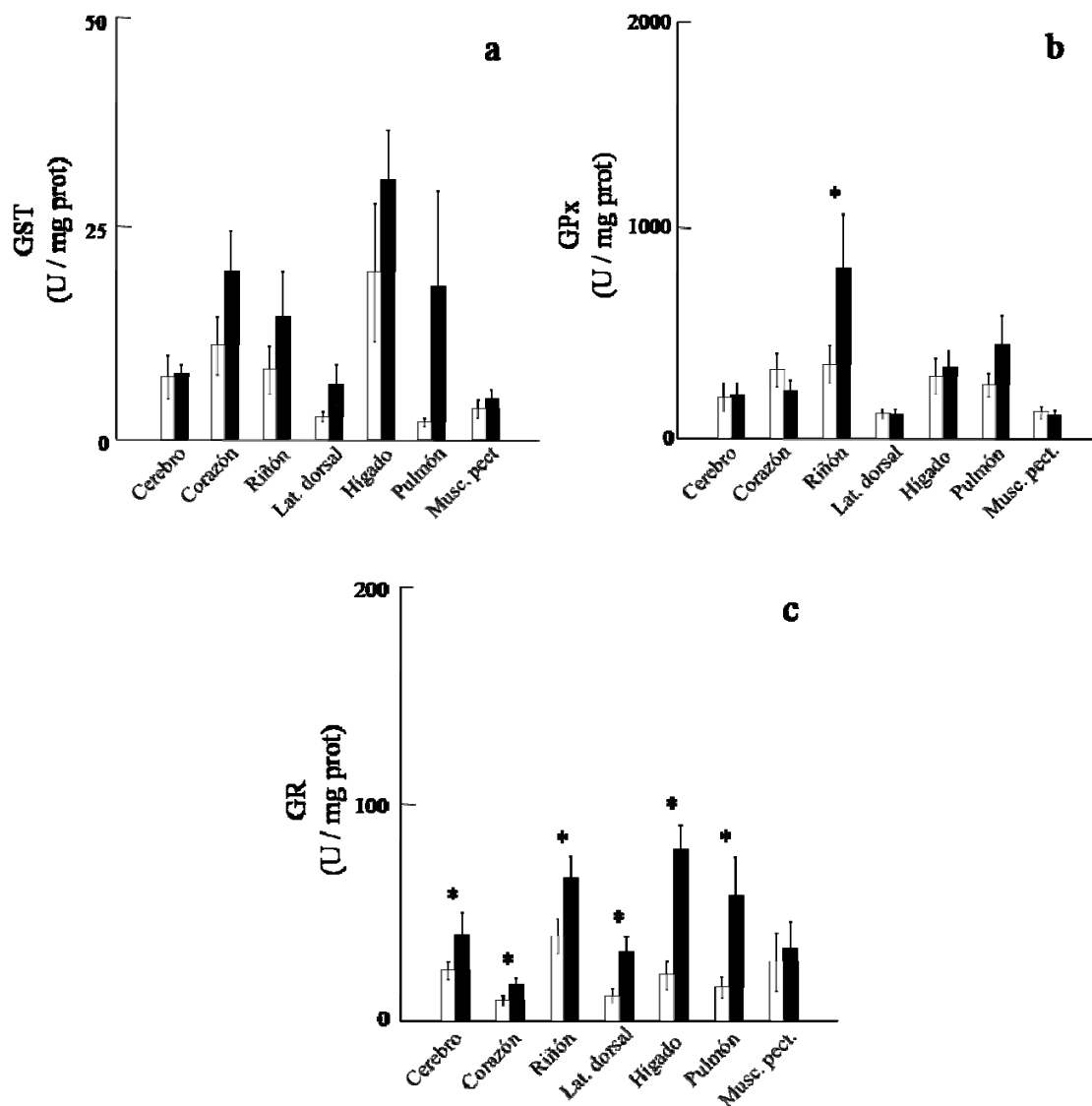


Figura 15. Actividad de las enzimas: a) Glutación S-transferasa (GST, unidades/mg proteína); b) Glutación peroxidasa (GPx, unidades/mg proteína) y c) Glutación reductasa (GR, unidades/mg proteína) en tejidos de kogias (□ n=11) y delfines (■ n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los * indican diferencias significativas entre grupos; $p < 0.05$.

6.2.4. Glutación y glutatión disulfuro

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tejidos analizados entre delfines y kogias para los equivalentes de GSH (GSH-Eq), GSH y en la proporción GSSG:GSH-Eq ($p > 0.05$) (Fig. 16a, c y d). Sin embargo, los contenidos de GSSG fueron significativamente mayores en cerebro, corazón, músculo lateral dorsal, hígado, pulmón y músculo pectoral de *Kogia spp.* en comparación con los mismos tejidos de delfines ($p = 0.00001$, $p = 0.005$, $p = 0.011$, $p = 0.00001$, $p = 0.00001$ y $p = 0.00001$, respectivamente) (Fig. 16b).

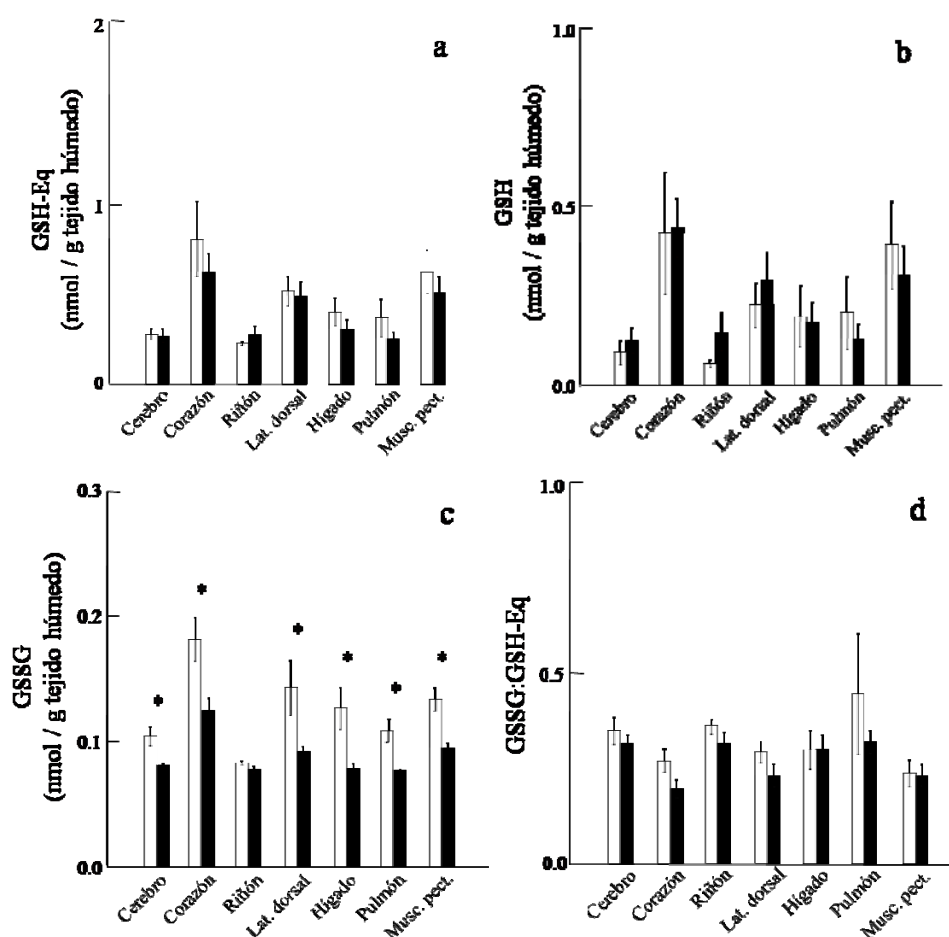


Figura 16. a) Contenido total de glutatión (GSH-Eq, nmol/g de tejido húmedo); b) contenido de glutatión reducido (GSH, nanomoles/g de tejido húmedo); c) contenido de glutatión disulfuro (GSSG, nmol/g de tejido húmedo); y d) tasa de GSSG:GSH-Eq en tejidos de kogias (\square n=11) y delfines (\blacksquare n=19). Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los * indican diferencias significativas entre grupos; $p < 0.05$.

7. Discusión

7.1. Diferencias entre tejidos de delfines y kogias de los indicadores de estrés oxidativo

A pesar de que se encontraron diferencias en los indicadores de estrés oxidativo entre kogias y delfines, la producción de O_2^- , los niveles de lípidos y proteínas oxidados y los niveles de antioxidantes tuvieron patrones similares en los tejidos analizados de ambos grupos. Tanto kogias como delfines presentaron una producción significativamente mayor de O_2^- en pulmón en relación al resto de los tejidos (Tabla I y II; Fig. 2 y 7). No existieron diferencias significativas en los niveles de TBARS entre tejidos en ninguno de los 2 grupos. Sin embargo, tanto en delfines como en kogias los niveles de carbonilos proteicos fueron significativamente mayores en pulmón que en cerebro y en los músculos analizados (Tabla I y II; Fig. 3b y 8b). En un principio se pensaba que los pulmones en mamíferos marinos estaban diseñados para almacenar oxígeno durante el buceo (Kooyman, 1989). Posteriormente se observó que en proporción al tamaño del cuerpo, los pulmones de estos organismos son menores que los de sus contrapartes terrestres, y que entre mamíferos buceadores el tamaño de los pulmones disminuía en organismos que realizan buceos profundos (Kooyman y Ponganis, 1998). Se reportó que algunos mamíferos buceadores exhalaban antes de empezar un buceo, probablemente con el fin de disminuir el riesgo del síndrome de descompresión durante el ascenso, y que los pulmones se colapsaban en la primera parte del descenso y así se exhalaba el resto del aire, dejando un pequeño remanente (Costa; 1999; Elsner, 1999; Johnson et al., 2005). Esta exhalación provoca que los pulmones permanezcan comprimidos y anóxicos durante el buceo (Johnson et al., 2005). Una vez

en superficie, con ayuda del remanente de aire y de las elevadas cantidades de surfactante pulmonar reportadas para mamíferos buceadores, los pulmones logran distenderse en la inspiración post-buceo para renovar el almacén de O₂ en el cuerpo y distribuirlo a los demás tejidos (Foot et al., 2006).

Esta reintroducción de O₂ al pulmón después de un periodo prolongado de isquemia puede ocasionar un aumento en la producción de moléculas oxidantes (Johnson et al., 2005). Se ha encontrado que las ERO pueden causar peroxidación lipídica y modificaciones a proteínas con función de surfactante pulmonar, y que los pulmones de mamíferos buceadores pueden presentar mayores niveles de carbonilos proteicos en comparación con los de organismos no buceadores (Haddad et al., 1994; Marzan et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2007). Los altos niveles de carbonilos proteicos encontrados en pulmón de delfines y kogias, podrían estar relacionados con la producción de O₂^{•-} en este tejido, ya que una elevada formación de ERO genera la oxidación de algunos residuos de aminoácidos, la segmentación del esqueleto peptídico o la segmentación de proteínas por la oxidación de residuos de glutamil, que pueden resultar en modificaciones irreversibles, como la carbonilación (Standman y Levine, 2000; Dalle-Donne et al., 2006a). Por otro lado, se han reportado actividades elevadas de enzimas antioxidantes en pulmón de conejos y ratas expuestos a ciclos de hipoxia-reoxigenación con el fin de proteger al tejido durante la reoxigenación (Frank, 1982; Jackson et al., 1992). Diversos estudios han demostrado que el pulmón de mamíferos marinos presenta adaptaciones al buceo, como son un surfactante pulmonar anti-adhesivo y muy fluido, mayor actividad de SOD y GPx, así como una tasa elevada en el reciclamiento y mantenimiento de los niveles de GSH (Spragg et al., 2004; Foot et al., 2006; Vázquez-Medina et al., 2006, 2007). A pesar de que se encontraron niveles

elevados de carbonilos proteicos, también se encontró una correlación positiva entre estos niveles y las actividades de SOD-CuZn y GR en pulmón de delfines y kogias. Lo anterior puede ser un mecanismo de defensa del pulmón en donde la SOD-CuZn actúa contra la entrada abrupta de O_2 después de la isquemia asociada al buceo, mientras que la GR podría estar actuando en el reciclamiento de la GSH (Halliwell y Gutteridge, 2007). Los resultados sugieren que estas correlaciones quizá no evitan la formación de carbonilos proteicos pero probablemente si un daño oxidativo más profundo como edemas, hemorragias e inflamación que le impedirían a organismos expuestos a constantes ciclos de isquemia-reperfusión, como los mamíferos marinos, sobrevivir por un tiempo prolongado (Jackson et al., 1992; Awasthi et al., 1998; Johnson et al., 2005).

Contrario al pulmón, el cerebro de delfines y kogias presentó una de las tasas de producción de O_2^- más bajas, al igual que uno de los niveles de carbonilos proteicos más bajos (Tabla I y II; Fig. 2, 3b, 7 y 8b). Durante los periodos de isquemia, los mamíferos buceadores tienen la capacidad de alterar el flujo sanguíneo distribuyéndolo a órganos sensibles a la hipoxia como el corazón y el cerebro, gracias al mecanismo reflejo mediado por barorreceptores (Kooyman, 1989; Elsner, 1999). El cerebro destina del 50 al 60% del ATP al transporte de iones a través de las membranas celulares, lo que contribuye a mantener la homeostasis iónica de las células (Lipton, 1999). Esta elevada producción de ATP es aportada por la oxidación de la glucosa; cuando se bloquea la distribución de glucosa y O_2 , mediante la disminución del flujo sanguíneo durante un buceo, ocurre un agotamiento energético apresurado, una despolarización de las membranas celulares y una disrupción en la homeostasis del calcio (Lutz y Prentice, 2002; Hermes-Lima, 2004b). Sin embargo, a pesar de la distribución del flujo sanguíneo

preferentemente al sistema nervioso durante el buceo, cuando la bradicardia que acompaña a esta vasoconstricción periférica llega a ser demasiado pausada, como ocurre durante y al final de buceos largos, se genera una disminución en el aporte de O_2 a este tejido (Andersen, 1966; Murphy et al., 1980; Elsner, 1999; Williams et al., 2008). La sensibilidad del cerebro de mamíferos a periodos prolongados de hipoxia sugiere que en mamíferos buceadores este tejido cuenta con mecanismos de defensa necesarios para evitar algún daño durante y después del buceo. Se han encontrado diversas adaptaciones en cerebro de focas para soportar periodos de hipoxia, como son elevadas actividades de enzimas relacionadas con metabolismo anaerobio (hexoquinasas, lactato deshidrogenasa (LDH) y trifosfato isomerasa) y concentraciones elevadas de Hb y de globinas neurales residentes (RNG, por sus siglas en inglés), en comparación con el cerebro de mamíferos terrestres (Murphy et al., 1980; Behrisch y Elsner, 1984; Elsner, 1999; Williams et al., 2008).

En este trabajo el cerebro de kogias mostró una actividad significativamente mayor de SOD-Mn que hígado y pulmón (Fig. 4b y 9b; $p < 0.05$). Por otro lado, en delfines se encontró una correlación negativa en la actividad de CAT y los niveles de GSH con la producción de O_2^- , una correlación negativa entre las actividades de SOD y SOD-Mn con los niveles de carbonilos proteicos en cerebro. Mientras que en kogias se encontró una correlación negativa entre la actividad de GST y los niveles de TBARS y la actividad de SOD con los niveles de carbonilos proteicos en cerebro. Estos resultados indican la existencia de diferentes mecanismos de defensa antioxidante en cerebro de buceadores profundos y someros. Ya que a pesar de no sufrir un interrupción abrupta en el flujo de O_2 , la bradicardia puede acentuarse dependiendo el buceo de manera tal que deje al cerebro por periodos cada vez más prolongados de hipoxia (Elsner, 1999). Los

resultados de este tejido son de sumo interés debido a que durante años las investigaciones sobre la fisiología del buceo de mamíferos marinos se han enfocado a las fuentes de energía del cerebro durante la hipoxia, haciendo a un lado los mecanismos de defensa antioxidante necesarios para proteger al cerebro durante los periodos de reoxigenación.

El corazón de delfín presentó cantidades significativamente mayores de GSSG y GSH en comparación con el resto de los tejidos del mismo grupo (Fig. 6b y c). En korgias las cantidades de GSSG fueron significativamente mayores en corazón que en cerebro, riñón y pulmón y GSH fue significativamente mayor en corazón que en riñón (Fig. 11b y c). El corazón de mamíferos, junto con el cerebro, es uno de los tejidos más intolerantes a la disminución del flujo sanguíneo, por lo que la bradicardia y la vasoconstricción periférica que ocurren durante el buceo ayudan a mantener una fuente de O₂ a ambos órganos por más tiempo, en comparación con los órganos periféricos (Elsner, 1999). El grado de bradicardia varía entre especies y entre buceos. Durante buceos profundos la bradicardia se ve acentuada, y en algunas ocasiones el flujo sanguíneo a las coronarias cesa por completo por periodos que van desde algunos segundos hasta 1 minuto (Kooyman, 1989; Elsner et al., 1998). Por lo que el corazón requiere de adaptaciones que le permitan tolerar los pequeños ciclos de isquemia-reperfusión durante un buceo prolongado, al igual que el cerebro.

Para mantener los niveles de O₂ en los tejidos durante el buceo, los cetáceos utilizan principalmente las reservas almacenadas en la sangre y el músculo, ya que la concentración de mioglobina en aves y mamíferos que bucean es al menos de 10 a 30 veces mayor que en especies terrestres (Kooyman, 1989). Sin embargo, se ha

encontrado que en vertebrados acuáticos el corazón puede utilizar metabolismo anaerobio durante buceos prolongados y que este órgano presenta grandes almacenes de glucógeno (Willmore y Storey, 1997). Por otro lado, también se han encontrado adaptaciones en el metabolismo oxidativo del corazón en mamíferos buceadores. Actividades elevadas de enzimas como SOD, GPx, GST, GR y G6PDH, así como mayor AOX y menor síntesis de HX encontradas en corazón de foca anillada en comparación con corazón de cerdo, sugieren una protección adicional en este tejido contra la exposición a elevadas cantidades de ERO (Elsner et al., 1998; Zenteno-Savín et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2006, 2007).

Aunque no se encontraron diferencias significativas en las actividades de enzimas antioxidantes entre tejidos en cada uno de los dos grupos analizados, se encontraron correlaciones positivas en el corazón de delfines entre los niveles de TBARS y las actividades de SOD-Mn y GST, así como la actividad de CAT con los niveles de carbonilos proteicos. Las kogias mostraron una correlación positiva entre la actividad de CAT y los niveles de TBARS. Estos resultados indican una respuesta de las defensas antioxidantes ante daños a lípidos y proteínas, posiblemente para proteger al corazón contra un mayor daño oxidativo. Por otro lado, los niveles de GSH y GSSG indican que estos juegan un papel importante en el metabolismo oxidativo del corazón de mamíferos buceadores. Una las adaptaciones observadas en tortuga japonesa para tolerar periodos de isquemia-reperfusión en corazón, es el aumento en la actividad de enzimas relacionadas con la producción de GSH, ya que se encontró que las actividades de GR y glutatión sintetasa (GS) aumentaban un 64% y hasta 2 veces su actividad basal, respectivamente, en condiciones de reoxigenación (Willmore y Storey, 1997). Se reportó una elevada actividad de GR y G6PDH y altas concentraciones de GSH-Eq,

GSH y GSSG relacionadas con niveles bajos de TBARS y carbonilos proteicos en corazón de foca anillada, en comparación con el mismo tejido de cerdo, lo que confirma que el sistema glutatión tiene un papel importante en la neutralización de ERO formadas durante la reoxigenación (Zenteno-Savín et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2007). El sistema glutatión también juega un papel importante en el corazón de mamíferos en términos de la regulación de la actividad de factores de transcripción como HIF-1 y factor nuclear- κ B (NF- κ B, por sus siglas en inglés), ya que la activación de estos factores no solo es sensible a cambios de O₂ sino también a cambios en el metabolismo redox (Haddad et al., 2000; Nordberg y Arnér, 2001). Tanto el HIF-1 como el NF- κ B están asociados a las respuestas adaptativas contra la hipoxia, ya que están encargados de la activación de genes que promueven el desarrollo vascular, metabolismo glucolítico y otras respuestas celulares contra el daño oxidativo (Haddad et al., 2000; Johnson et al., 2004). Los resultados encontrados en este trabajo, así como lo que se ha reportado en la literatura, indican que además del papel que tienen las enzimas antioxidantes en la protección del corazón, el sistema GSH es uno de los principales mecanismos de defensa contra pequeños ciclos de hipoxia-reoxigenación en corazón de mamíferos buceadores.

Entre los órganos que sufren isquemia durante el buceo se encuentra el riñón (Kooyman, 1989; Elsner, 1999). En delfines y kogias se observó una actividad significativamente mayor de CAT, GPx y GR en riñón que en cerebro, músculos lateral dorsal y pectoral, corazón y pulmón (Fig. 4d, 5b y c, 9d y 10b y c). En mamíferos en reposo el flujo sanguíneo renal y hepático contribuye a un 50% del gasto cardíaco total. Por lo tanto, en mamíferos marinos cualquier reducción en el flujo sanguíneo a estos

órganos durante el buceo representa un ahorro substancial en el gasto cardiaco y en el consumo de O₂ (Kooyman, 1989). Durante inmersiones forzadas en focas el flujo sanguíneo renal disminuye (White et al., 1973). En estos organismos hay una relación directa entre el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular, por lo que la reducción del flujo sanguíneo también causa una disminución en la excreción de Na⁺ y en la producción de orina (Kochier et al., 1974; Kooyman, 1989; Fuson et al., 2003). Diversos estudios han comprobado la alta capacidad que tienen los riñones de focas para tolerar periodos de isquemia-reperfusión en comparación con mamíferos terrestres como perros o ratas. Por ejemplo, el transporte de iones y cationes se mantiene durante y después de un periodo prolongado de isquemia, así como el restablecimiento del flujo sanguíneo renal y producción de orina que ocurren con mayor rapidez en riñón de foca que de perro (Halasz et al., 1974; Koschier et al., 1978; Kooyman, 1989).

Se han encontrado respuestas antioxidantes en riñones de vertebrados expuestos a periodos de hipoxia y reoxigenación (Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002). En foca anillada se ha reportado una mayor actividad de CAT en riñón que en músculo, corazón y pulmón, y una elevada actividad de enzimas como GR y G6PDH, así como poca formación de HX y bajos niveles de TBARS en comparación el cerdo (Elsner et al., 1998; Zenteno-Savín et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2006, 2007).

Los estudios en focas, en conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren un papel de las enzimas como CAT, GPx y GR para mantener la integridad del riñón a los ciclos de isquemia-reoxigenación. Se encontró que el riñón de foca anillada tiene una dependencia importante del metabolismo lipídico, ya que se ha encontrado una elevada la actividad de la enzima β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HOAD), la cual cataliza la oxidación de la 3-hidroxiacil-CoA en el tercer paso de la beta oxidación

e indica el potencial del metabolismo aeróbico basado en grasas (Fuson et al., 2003). Además, se encontró una correlación positiva en riñón de kogias entre la producción de O_2^- y la actividad de SOD-Mn y GPx. La GPx junto con CAT podrían estar actuando en conjunto para evitar la oxidación lipídica que pudiera ocurrir en este tejido durante la reperfusión, ya que tanto CAT como GPx se encargan de remover los hidroperóxidos que causan daño oxidativo a lípidos. También se encontró una correlación positiva en los niveles de carbonilos proteicos y la concentración de GSSG de riñón de delfines. La elevada actividad de GR podría estar actuando para proteger a la célula contra un desbalance en el estado oxidado, convirtiendo el GSSG a GSH para mantener los niveles de este último y su capacidad antioxidante disponible (Meister y Anderson, 1983). Lo anterior, junto con el transporte de GSSG hacia el exterior de la célula y la rápida absorción de GSH del plasma por el riñón, podría tener un papel importante en la regulación del sistema redox en este tejido (Bartoli y Sies, 1978; Sen et al., 1994).

El hígado mostró mayor actividad antioxidante de CAT, GST, GPx y GR que cerebro, pulmón y músculos lateral dorsal y pectoral de delfin, mientras que en las kogias mostró, mayor producción de O_2^- , mayor actividad de CAT que cerebro, pulmón y ambos músculos, y mayor actividad de GST y GPx que el músculo lateral dorsal y pulmón. El hígado de mamíferos marinos al igual que el riñón ha mostrado tener una tolerancia elevada a la isquemia durante el buceo gracias a una elevada actividad de las enzimas LDH y HOAD comparada con otros tejidos del mismo grupo, y con hígado de mamíferos terrestres. Estas adaptaciones permiten que el hígado pueda cambiar de un metabolismo aerobio a una producción de ATP anaerobia en caso de ser necesario (Kooyman, 1989; Elsner, 1999; Fuson et al., 2003). Estudios de las defensas

antioxidantes en hígados de tortuga japonesa y foca anillada han encontrado elevadas actividades de CAT, GST y G6PDH en este órgano (Willmore y Storey, 1997; Vázquez-Medina et al., 2006, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes aluden a una protección del hígado de mamíferos marinos ante los ciclos de isquemia-reperfusión a los que están expuestos, ya que al haber una sobreproducción de O_2^- durante la reoxigenación, este no solo puede dañar las biomoléculas directamente, sino a través de productos citotóxicos y mutagénicos obtenidos a partir de la degradación de otras biomoléculas (Marnett et al., 2003). En este estudio también se encontró una correlación positiva entre los niveles de TBARS y la cantidad de GSH-Eq y GSH en hígado de delfines y kogias, así como una correlación positiva entre los niveles de GSH-Eq y los niveles de carbonilos proteicos. Esto puede estar relacionado con el papel de GSH en la actividad de GST y GPx, las cuales junto con CAT se encargan de la remoción de hidroperóxidos y la eliminación de los productos secundarios de la oxidación de lípidos como acetaldehídos y peróxidos de ácidos grasos, con el fin de mantener el estado redox celular (Willmore y Storey, 1997; Hayes et al., 2005).

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de GSH o GSSG en el hígado de delfines y kogias, diversos estudios han reportado que este tejido presenta una síntesis elevada de GSH, y que incluso se encuentra dentro de los órganos que sintetizan su propio GSH y contribuyen a las reservas de glutatión en el plasma (Bartoli y Sies, 1978; Anderson y Sies, 1996). Los niveles de GSH disminuyen en hígado después de un ejercicio extremo, presumiblemente con el fin de contrarrestar la producción endógena de ERO y la peroxidación de lípidos, tanto en hígado como en músculos (Lew et al., 1989). En

mamíferos marinos el elevado metabolismo del hígado sugiere que este tejido cuenta con una serie de defensas que le permitan tolerar los ciclos de isquemia-reperusión, responder ante periodos de ejercicio vigoroso, mantener los niveles de GSH, la movilización de lípidos y el cambio de metabolismo aerobio a anaerobio, sin que ocurra algún daño en el tejido. Se propone que la presencia de GSH-Eq y GSH, la actividad de las enzimas del metabolismo oxidativo (CAT, GST, GPx y G6PDH), ayudan al hígado de mamíferos buceadores a protegerse contra posibles daños ocurridos durante el los ciclos de isquemia-reperusión asociados al buceo.

Dependiendo del tipo de buceo en mamíferos marinos, la reducción del flujo sanguíneo varía aumentando o disminuyendo el grado de isquemia en órganos viscerales, piel y músculos (Elsner, 1999). Los mamíferos buceadores requieren tener métodos de locomoción energéticamente eficientes, sobre todo durante buceos en los que los niveles de O₂ disminuyen (Kooyman, 1989). Diversos estudios han encontrado que algunos tipos de locomoción, por ejemplo el marsopeo, dejarse llevar por las olas y rutinas de velocidad, permiten a los delfines ahorrar energía y prolongar el metabolismo aerobio durante el nado (Williams et al., 1999a). Los cetáceos también cuentan con altas concentraciones de Mb en los músculos para almacenar O₂, que llegan a ser hasta 8 veces mayores que en mamíferos terrestres, así como un volumen sanguíneo más elevado (Kooyman, 1989; Elsner, 1999; Noren y Williams, 2000). Durante el nado activo se incrementa la tasa metabólica muscular, la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, el consumo de O₂ (Ji et al., 1998). La reoxigenación después de la isquemia provoca que el músculo esté expuesto a una elevada producción de ERO.

Tanto en delfines como en kogias se encontró que ambos músculos (pectoral y lateral dorsal) presentaron significativamente menor actividad de CAT que el corazón, riñón e hígado (Fig. 4d y 9d). La actividad de GPx fue significativamente menor en músculo lateral dorsal en comparación con el riñón, hígado y pulmón de delfín, mientras que los 2 músculos de kogias mostraron menor actividad de GPx que el riñón, y en el caso del músculo pectoral también menor actividad que el corazón. En kogias y delfines la actividad de GR fue significativamente menor en ambos músculos que en riñón y en el caso de delfines, también significativamente menor que en hígado. En general, la actividad de las enzimas antioxidantes fue menor en los músculos en comparación con el resto de los tejidos de ambos grupos. Zenteno-Savín et al. (2002) reportaron mayores niveles de producción de O_2^- y mayores niveles de TBARS en músculo de foca anillada, en comparación con el cerdo común. Se ha encontrado que en buceadores activos como la foca de Weddell, los niveles metabólicos y la densidad mitocondrial en músculos son elevados, lo que ocasiona que sus reservas de O_2 se agoten rápidamente; para lidiar con la falta de O_2 en músculos, estos organismos cuentan con adaptaciones para mantener un aporte constante de energía utilizando metabolismo anaerobio (Kanatous et al., 20002). Sin embargo, debido a que no se encontraron niveles de TBARS ni de carbonilos proteicos significativamente elevados, ni bajas actividades de las enzimas antioxidantes, se propone la existencia de mecanismos alternos de protección para evitar el daño por ERO en músculos de cetáceos. En músculo pectoral de kogias se encontró una correlación positiva entre la producción de O_2^- y las actividades de SOD-CuZn, GST, GR y las cantidades de GSH, así como una correlación positiva entre los niveles de TBARS y las actividades de GST y GR. Estos resultados demuestran que aunque la actividad de las enzimas haya sido

menor en el músculo pectoral en comparación con el resto de los tejidos, existe un papel de éstas para evitar algún daño oxidativo, en este caso a lípidos o proteínas. Otro mecanismo de defensa que podría estar actuando en este tejido es la presencia de estrógenos. Se ha encontrado que los estrógenos tienen un papel importante en la protección de músculo esquelético debido a que pueden evitar la peroxidación de lípidos debido a su estructura parecida a la vitamina E y a que reducen los niveles de creatina kinasa en el suero, así como el dolor muscular de aparición tardía (DOMS, por sus siglas en inglés) (Persky et al., 2000).

En kogias se observó menor producción de O_2^- en músculo lateral dorsal que en hígado y pulmón y menores niveles de carbonilos proteicos que en corazón, riñón, hígado y pulmón (Tabla II; Fig. 12 y 13b), así como mayor actividad de SOD-CuZn que en hígado y pulmón (Fig. 14c). También se encontró una correlación positiva entre la actividad de GR y la producción de O_2^- . Se ha reportado que en buceadores profundos los niveles del metabolismo energético y la densidad mitocondrial no difieren de mamíferos terrestres sedentarios (Kanatous et al., 2002). Durante el descenso los buceadores profundos no requieren de un elevado consumo de O_2 ya que ahorran energía de manera significativa utilizando cambios en la flotabilidad (exhalando el aire contenido en los pulmones), el impulso de la aleta caudal para deslizarse y cambios en la densidad de los lípidos del órgano de espermaceti en el caso de cachalotes, mientras que en el ascenso utilizan la condensación de estos lípidos para ahorrar energía (Fernández-Casado, 2000; Kanatous et al., 2002). A pesar de las características metabólicas de los buceadores profundos, los músculos dorsales de las kogias, al igual que en el resto de los cetáceos, son los más importantes para la locomoción, ya que son los que proporcionan más fuerza propulsiva durante el nado en comparación con los

músculos ventrales o pectorales (Thewissen, 2002). A diferencia de otros músculos, lateral dorsal requiere mayor consumo de O_2 y, por lo tanto, se encuentra más susceptible a la disminución del mismo durante el nado. La elevada actividad de SOD-CuZn encontrada en este tejido podría estar contrarrestando la producción de ERO durante la reoxigenación en especies que realizan buceos profundos, como las kogias.

7.2. Diferencias de los indicadores de estrés oxidativo entre delfines y kogias

Las capacidades de buceo de los mamíferos marinos varían significativamente entre grupos debido al tipo de alimentación, la distribución, el tamaño y la edad del organismo (Steward, 2002; Willis y Baird, 1998). El presente estudio se realizó con la finalidad de conocer el metabolismo oxidativo de dos grupos de mamíferos buceadores, y para analizar las diferencias en los indicadores de estrés oxidativo entre un grupo de buceadores someros (delfines) y otro de buceadores profundos (kogias).

Las especies del género *Kogia* que se incluyen dentro de la familia Physeteridae, han sido catalogadas como buceadores profundos por diversos autores (Davies et al., 1998; Baird, 2005). Esto se ha comprobado con estudios de contenidos estomacales, en donde se ha encontrado que su dieta se basa principalmente en calamares, aunque también se han encontrado mísidos, cangrejos y peces pequeños que constituyen un menor porcentaje de sus presas (Baird et al., 1996; Willis y Baird, 1998; Cardona-Maldonado y Mugnucci-Giannoni, 1999). La ecología de estas presas, así como la distribución de las kogias, sugieren que estos organismos prefieren alimentarse en aguas profundas muchas veces fuera de la plataforma continental (Santos et al., 2006). A pesar de que las especies de calamar que se han encontrado como presas de kogias realizan

migraciones nocturnas hacia la superficie, sugiriendo la posibilidad de que éstas las cacen durante la noche, la presencia de mísidos de la especie *Gnathophausia ingens* que se distribuyen en profundidades entre 600 y 1,500 m (Sanders y Childress, 1990; Beatson, 2007), cangrejos y peces abisales (como el pez víbora *Chauliodus sloani*, que se ha encontrado en profundidades de hasta 2,800 m) (Butler et al., 2001), apoyan la hipótesis de que las kogias suelen cazar en aguas profundas para obtener su alimento (Willis y Baird, 1998).

A pesar de su tipo de alimentación, las kogias no suelen ser organismos de nado activo o vigoroso. Generalmente se les encuentra flotando en la superficie con la cabeza y la aleta dorsal expuesta, de la misma manera que los cachalotes (Breese y Tershy, 1993; Baird et al., 1996; Witthead, 2002). Durante sus periodos de buceo se ha reportado que al menos *K. sima* puede permanecer sumergida hasta por 25 minutos con un periodo en superficie de 3 minutos en promedio, aunque se han registrado buceos más prolongados (Willis y Baird, 1998).

La familia Delphinidae incluye a todas las especies de delfines que se analizaron en este trabajo (*Tursiops truncatus*, *Delphinus delphis*, *D. capensis* y *Stenella coeruleoalba*). Al igual que la mayoría de los delfines, estas 4 especies se alimentan principalmente de peces, aunque también se ha reportado que consumen calamares y cangrejos (Archer, 2002; Perrin, 2002; Wells y Scott, 2002). Las presas más frecuentes de *T. truncatus* son sciaénidos, mugílidos y scombridos (Wells y Scott, 2002), estos últimos también son presa de *D. delphis* y *D. capensis* que también se alimentan de clupeidos y pequeños calamares (Perrin, 2002). *S. coeruleoalba* se alimenta de peces de la familia myctophidae y también de calamares pequeños (Archer, 2002). Los delfines han sido catalogados como especies muy activas con nado vigoroso, que alcanzan

velocidades de hasta 8.3 m/s (Lang, 1975). *T. truncatus* suele hacer persecuciones rápidas con volteretas y acrobacias en la superficie cuando atrapa a las presas, golpea a sus presas con la aleta para noquearlas o las arrea nadando alrededor de ellas para desorientarlas (Wells y Scott, 2002). El delfín listado (*S. coeruleoalba*) ha sido ampliamente reconocido por realizar giros en la superficie (Archer, 2002). También se ha registrado que las especies de delfines analizadas en este trabajo realizan movimientos diarios en grupos pequeños (de entre 5 y 10 organismos) o grandes (desde 500 hasta 10 000) dependiendo de la especie (Jefferson et al., 1993; Archer, 2002; Perrin, 2002). En general, los delfines no suelen realizar buceos profundos. *T. truncatus* ha sido visto alimentándose en aguas someras de no más de 4 metros, y en zonas con pastos marinos (Barros y Wells, 1998). *D. capensis* ha sido reportado en aguas someras de entre 20 y 180 metros de profundidad (Carwardine, 1995). Tanto *T. truncatus* como *D. delphis* tienen promedios de buceo de 0.4 y 3 minutos, respectivamente, mientras que el máximo tiempo de buceo registrado para ambas especies es de 8 minutos (Ridgway y Harrison, 1986; Noren y Williams, 2000; Stewart, 2002). En el caso de *S. coeruleoalba* no se tienen registros de tiempo de buceo. Sin embargo, se ha registrado que esta especie puede bucear hasta 700 metros, con un promedio de profundidad de 250 metros (Archer, 2002), y en algunos estudios como el de Davis y colaboradores (1998), ha sido colocada en el grupo de especies profundas junto con el delfín de Risso y *Mesoplodon* spp. Sin embargo, se ha encontrado que los buceos más profundos no son necesariamente los más prolongados (Kooyman y Ponganis, 1998). Además de la evidencia ecológica, los resultados reportados de las variables analizadas en el presente trabajo no reflejaron diferencias entre *S. coeruleoalba* y el resto de los delfines, por lo que esta especie fue considerada como parte del grupo de buceadores someros.

En los resultados obtenidos de la producción de O_2^- y daño oxidativo en los grupos analizados, encontramos que la producción de O_2^- fue significativamente mayor en corazón, riñón, hígado, pulmón y músculo pectoral de kogias que de delfines, y aún en cerebro y músculo lateral dorsal, aunque no de manera significativa (Fig. 12). Los niveles de TBARS fueron significativamente mayores en delfines que en kogias en todos los tejidos analizados, excepto en cerebro, mientras que los niveles de carbonilos proteicos no mostraron diferencias entre grupos en ninguno de los tejidos analizados (Fig. 13).

Los dos grupos de odontocetos incluidos en este estudio, delfines y kogias, tienen comportamientos de buceo muy diferentes. Se sabe que los delfines además de ser buceadores someros son organismos sumamente activos (Wells y Scott, 2002; Perrin, 2002; Archer, 2002) mientras que las kogias tienen un comportamiento pasivo y suelen permanecer mucho tiempo inmóviles en la superficie entre buceos (Baird et al., 1996; Willis y Baird, 1998). Una alta actividad física sugiere una mayor tasa metabólica, lo que resulta en el aumento de la tasa de respiración mitocondrial y de fosforilación oxidativa, y a su vez en un incremento en la generación de ERO (Ji et al., 1998; Urso y Clarkson, 2003). Aunado a lo anterior, una serie repetida de ciclos de isquemia/reperfusión, como se anticipa en especies con buceos frecuentes de corta duración, incrementa la formación de ERO por el sistema X/XO (Hermes-Lima, 2004b; Kevin et al., 2005; Valko et al., 2007). Esto provoca que organismos con elevadas tasas metabólicas y ciclos de isquemia-reperfusión como los delfines, se encuentren más expuestos a una elevada formación de ERO (Ji et al., 1998; Urso y Clarkson, 2003; Johnson et al., 2004; Vázquez-Medina et al., 2006). Cuando hay un exceso de O_2^- en la

célula, las distintas formas de SOD reaccionan para dismutarlo y convertirlo a H_2O_2 y O_2 (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Diversos estudios en humanos y ratones han encontrado que la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, etc.) es mayor en organismos que realizan ejercicio vigoroso o continuo, y en personas que entrenan regularmente en comparación con personas no entrenadas; posiblemente con el fin de neutralizar la producción excesiva de ERO durante el ejercicio (Sen, 1995; Ørtenblad et al., 1997; Brites et al., 1999; Urso y Clarkson, 2003). A pesar de que se encontraron actividades significativamente mayores de SOD y sus isoenzimas en algunos tejidos de delfines, también se encontraron mayores niveles de TBARS en casi todos los tejidos de este grupo (Fig. 14). La producción de O_2^- y su dismutación por parte de las SOD producen H_2O_2 que es neutralizado por CAT o GPx. Se ha encontrado que cuando la producción de O_2^- es elevada existe daño a lípidos y otras biomoléculas, ya que el O_2^- y el H_2O_2 reaccionan en presencia de un metal de transición en la reacción de Haber-Weiss para formar OH^\cdot , considerado la ERO más importante en la iniciación de la peroxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 2007; Hermes-Lima, 2004a).

Cuando la interrupción de sangre a los tejidos es prolongada, puede haber efectos devastadores para el funcionamiento y metabolismo de tejidos. El tiempo suficiente para causar dichos efectos depende del tejido y del grado de privación de O_2 (Hermes-Lima 2004a y 2004b; Halliwell y Gutteridge, 2007). Durante la isquemia disminuyen los niveles de ATP y los gradientes de iones se ven alterados por la inactivación de las bombas Na^+/K^+ dependientes de ATP. Al mismo tiempo, se acumula HX y ocurre una transformación de XDH a XO, y la CTE entra en un estado reductor debido a la falta de formación de agua por la citocromo oxidasa, por lo que empieza a

haber una acumulación de electrones en el segundo nivel de la CTE (Hermes-Lima 2004a y 2004b; Halliwell y Gutteridge, 2007). Si la isquemia es prolongada estos productos se acumulan y durante la reperfusión ocurrirá una mayor formación de O_2^- por acción de la XO sobre la HX y la X, así como por la cantidad de electrones detenidos en la CTE que se ponen en circulación de nuevo y que reaccionan con O_2 (Kevin et al., 2005; Halliwell y Gutteridge, 2007). Aunque las kogias son organismos pasivos comparadas con los delfines, su capacidad de realizar buceos prolongados las hace susceptibles a la formación de ERO. Sin embargo, a pesar de que este grupo mostró una mayor producción de O_2^- y no mostró actividades enzimáticas mayores a las de delfines, el daño oxidativo a lípidos fue menor que en tejidos de delfines. Los organismos utilizan defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas para mantener un balance oxido-reducción apropiado. Dichas defensas pueden ser formadas de manera endógena (enzimas, péptidos) u obtenidas a partir de fuentes externas, principalmente de la dieta (vitaminas, minerales, carotenos, etc.) (Halliwell y Gutteridge, 2007). Las kogias se alimentan principalmente de calamares de distintas especies. Diversos estudios han reportado que los calamares presentan moléculas con una importante capacidad antioxidante, entre las que se encuentran carotenos, fosfolípidos y péptidos. Los cefalópodos se caracterizan por una marcada presencia de carotenos en sus tejidos, como resultado del tipo de alimentación (crustáceos principalmente) (Kantha, 1989). El principal caroteno encontrado en estos organismos es la astaxantina, que se incluye en los carotenos que contienen átomos de O_2 y los cuales han sido reportados por tener una actividad antioxidante elevada y una capacidad para retardar la formación de hidroperóxidos (Di Mascio et al., 1991; Mortensen et al., 1997). También se ha encontrado que los calamares poseen fosfolípidos que en conjunto con el α -tocoferol

presentan una alta capacidad antioxidante y provocan una mayor estabilidad a los lípidos (Cho et al., 2001). Adicionalmente, se encontraron péptidos obtenidos a partir de manto y gelatina de la piel del calamar, compuestos que mostraron una fuerte capacidad inhibitoria de peroxidación de lípidos y una capacidad antioxidante mayor que las vitaminas como el α -tocoferol y casi tan elevada como el antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés) (Mendis et al., 2005; Rajapakse et al., 2005).

El GSH tiene uno de los papeles principales en la defensa antioxidante de los organismos. Este tripéptido es sustrato de reacciones catalizadas por enzimas como la GPx y GST, ayuda a eliminar peróxidos, está involucrado en el metabolismo del ácido ascórbico, en la regulación de las actividades de muchas enzimas con un grupo tiol y en los mecanismos de señalización oxido-reducción (Ji et al., 1998; Hermes-Lima, 2004; Jones, 2006). Es por eso que los niveles intracelulares de GSH y GSSG están controlados enzimáticamente, por secreciones al plasma, como cuando se libera GSSG fuera de la célula una vez que sus niveles son muy elevados, o bien por efecto de las hormonas, ya que se ha reportado que elevados niveles de vasopresina promueven la liberación de GSH al plasma por parte del hígado, probablemente con el fin de distribuirlo a músculo esquelético durante el ejercicio (Lew y Quintanilla, 1985; Hermes-Lima, 2004). La GR se encarga de reducir el GSSG a GSH usando NADPH como cofactor para mantener el GSH disponible (Halliwell y Guteridge, 2007). Cambios en el estado redox de GSH/GSSH afectan la conformación de proteínas, la actividad de transportadores celulares, las interacciones proteína-proteína, proteína-ADN y la degradación de proteínas, entre otras (Kemp et al., 2008). En delfines la actividad de GR fue mayor en 6 de los 7 tejidos analizados, en comparación con los

tejidos de kogias (Fig. 15c). Esta diferencia sugiere un mecanismo de defensa importante en tejidos de delfines. En humanos y ratones se ha encontrado que durante el ejercicio prolongado la tasa de producción de ERO puede sobrepasar la tasa de reducción de GR y esto provoca que aumenten los niveles de GSSG, disminuyendo la disponibilidad de GSH (Sen, 1995; Leeuwenburgh et al., 1997; Ji et al., 1998). El incremento en la actividad de GR en los tejidos de delfines indica un mayor reciclamiento de GSH, evitando un desbalance del sistema redox glutatión (GSSG/2GSH) (Jones, 2006; Valko et al., 2007). No se encontraron diferencias en la proporción de GSSG:GSH-Eq, lo que indica una actividad eficiente de GR que contribuye a evitar el estado oxidado en la célula ocasionado por un exceso de GSSG. En las kogias los niveles de GSSG fueron significativamente mayores en cerebro, corazón, músculo lateral dorsal y pectoral, hígado y pulmón (Fig. 16b). A pesar de que la actividad de GR fue menor en kogias que en delfines, la proporción de GSSG:GSH-Eq no fue significativamente mayor en las primeras (Fig. 16d). La proporción de GSSG en relación al glutatión total (GSH-Eq) indica el estado de oxidación de una célula o tejido. Sin embargo, el hecho de que se hayan encontrado niveles mayores de GSSG en kogias sin alteración en la proporción GSSG:GSH-Eq puede indicar: 1) que los valores de GSSG no fueron suficientemente altos como para alterar el sistema redox GSSG:GSH-Eq, por lo que a pesar de tener mayores niveles de GSSG, estos pudieron ser neutralizados vía reducción de GR o por excreción al plasma, o 2) debido a que GSH es más abundante que GSSG en células (en proporción de 1:10), a bajas concentraciones se dificulta la lectura de GSSG en las muestras (Sies et al., 1983; Rahmna et al., 2007).

7.3. Marcadores de estrés oxidativo en mamíferos marinos con uso en biomedicina

El efecto que tiene la presencia de elevados niveles de ERO que no llegan a ser neutralizadas por antioxidantes, puede ser devastador para los sistemas biológicos ya que pueden ocurrir modificaciones a biomoléculas, muerte celular y necrosis (Matés et al., 1999; Valko et al., 2007). En el caso de los humanos, esto no es excepción. Desde el descubrimiento de las moléculas oxidantes, se ha encontrado que la producción excesiva de éstas puede generar enfermedades que van desde inflamación, arterioesclerosis, alergias, cáncer, diabetes, daños tisulares por isquemia-reperfusión, artritis reumatoide, granulomatosis crónica, hepatitis, SIDA, enfermedad de Parkinson y Alzheimer, entre otras (Matés et al., 1999).

Entre las alteraciones relacionadas con la isquemia-reperfusión están las arritmias, infarto al miocardio, artritis, embolias, daño en órganos durante trasplantes, inflamaciones, preeclampsia, apnea del sueño, etc. Dichas patologías se encuentran dentro de las causas principales de muerte en el mundo, por lo que diversos laboratorios a lo largo del mundo han enfocado sus estudios a la comprensión de las causas de estas enfermedades y a cómo prevenirlas (Hermes-Lima, 2004b).

Para evitar el daño en órganos durante trasplantes se han propuesto tratamientos en los que se encuentran la adición de antioxidantes a soluciones de perfusión para evitar el daño por reperfusión, así como la aplicación exógena de antioxidantes, lo cual ha sido útil durante trasplantes de riñón especialmente (Hernández y Granger, 1988; Hermes-Lima, 2004b).

En enfermedades como la artritis adyuvante inducida (AIA, por sus siglas en inglés) e inflamaciones inducidas por carragenina, se han utilizado las aplicaciones

orales e intraperitoneales de SOD en ratones. En la AIA se encontró que con dosis orales los organismos mostraban menor lipoperoxidación en plasma, en comparación con tratamientos a base de naproxeno y dexametasona (García-Hernández et al., 1999a). En el caso de las inflamaciones, la aplicación intraperitoneal de SOD obtenida a partir de la levadura *Debaryomyces hansenii*, inhibe las 3 etapas de desarrollo de edemas inducido por carragenina (EIC) en ratones (García-Hernández et al., 1999b). También se ha encontrado que ratones con sepsias tratados con un soporte básico de antibióticos y con un soporte antioxidante a base de un quelante de fierro (deferroxamina) y de N-acetil-cisteína (NAC), un aminoácido modificado que funciona como antioxidante por que puede donar grupos -SH, han mostrado niveles más bajos de TBARS y de producción de O_2^- así como una actividad de SOD y CAT más elevada en comparación con ratones no tratados con el soporte de antioxidantes (Ritter et al., 2004).

Otra de las estrategias terapéuticas con antioxidantes es la sobreexpresión de enzimas para controlar enfermedades como el cáncer. Weydert y colaboradores (2006) encontraron que la terapia génica con SOD-CuZn y SOD-Mn a partir de un adenovirus, provoca el aumento en la actividad de estas enzimas en 3 líneas celulares de cáncer de mama provocando que disminuya su crecimiento y sobrevivencia en experimentos *in vivo* (Weydert et al., 2006). De la misma manera, se ha encontrado que la sobreexpresión de la SOD-Mn ayuda a disminuir significativamente la necrosis en el miocardio después de un periodo de isquemia-reperfusión en ratones (Jones et al., 2003).

Se ha encontrado que organismos buceadores expuestos a ciclos de isquemia-reperfusión tienen mayor capacidad para neutralizar oxidantes y evitar daño oxidativo que organismos no buceadores (Elsner et al., 1998; Wilhelm-Filho et al., 2002;

Zenteno-Savín et al., 2002; Vázquez-Medina et al., 2006, 2007). En estos organismos, los tejidos expuestos a isquemias prolongadas presentan mayor actividad de las defensas antioxidantes para protegerlos durante la reoxigenación (Zenteno-Savín et al., 2002). Sin embargo, en este trabajo se encontró que en odontocetos la actividad de dichas defensas también varía dependiendo del metabolismo del tejido y de su importancia en la locomoción durante el nado. Los odontocetos son organismos que están bien adaptados a la vida acuática, ya que cuentan con cuerpos fusiformes (principalmente delfines y marsopas), piel hidrodinámica, altas capacidades para termorregular y tolerancia a la isquemia, entre otras (Kooyman, 1989; Noren y Williams, 2000; LeDuc, 2002). Dicha tolerancia a la isquemia es el resultado no solo de su capacidad para usar metabolismo anaerobio sino también de la actividad de moléculas encargadas de neutralizar la producción de ERO durante la reoxigenación (Zenteno-Savín et al., 2002; Fuson et al., 2003; Vázquez-Medina et al., 2006 y 2007).

Las diferencias encontradas en los indicadores de estrés oxidativo entre tejidos de delfines y kogias, sugieren mecanismos diferentes de protección. En este trabajo se encontró que en tejidos más sensibles a periodos de isquemia, como el cerebro y el corazón, los antioxidantes con mayor actividad fueron los encargados de neutralizar las primeras ERO formadas, como son la SOD y sus isoenzimas, en comparación con los antioxidantes encargadas de la detoxificación y la remoción de peróxidos (CAT y GPx). En tejidos adaptados a tolerar periodos de isquemia como hígado y riñón, las enzimas encargadas de la remoción de hidroperóxidos y otros compuestos oxidados, así como el sistema GSH, parecen tener mayor importancia. Por otro lado, tejidos con elevada actividad metabólica y que también sufren periodos de isquemia como los músculos, utilizan como defensa a las enzimas encargadas de remover la primera ERO formada

(SOD) y al sistema GSH. Estos resultados sugieren que cada tejido utiliza diferentes moléculas para mantener un estado reducido en los órganos durante y después del buceo.

Tomando en cuenta lo anterior y la importancia que están tomando los tratamientos a base de antioxidantes en medicina, se podría considerar que cada tratamiento debería de variar de acuerdo al tejido a tratar. Es decir, tejidos que están relacionados con el ejercicio extenuante como músculos de atletas deberían ser tratados con moléculas que permitan eliminar al O_2^- , una de las primeras ERO formada que promueve la generación de otras (Hermes-Lima, 2004a). Los órganos con elevadas tasas metabólicas que están relacionados con desechos del organismo, como hígado y riñón, requieren de mayor protección por parte de moléculas relacionadas con la eliminación de compuestos oxidados y de xenobióticos, como son GPx, GST y GSH (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Las diferencias encontradas a nivel de antioxidantes y daño por oxidantes entre organismos tolerantes a largos periodos de isquemia, como las kogias, y organismos que suelen exponerse a periodos cortos de isquemia y que realizan ejercicio vigoroso, como delfines, sugieren que dichas moléculas podrían ser clave para el desarrollo de propuestas terapéuticas contra enfermedades relacionadas con la isquemia-reperfusión, así como para tratamientos contra daño causado por ERO durante el ejercicio.

Sin embargo, para realizar estudios similares al presente, se requieren muestras de tejidos de organismos que en ocasiones están en peligro de extinción o se encuentran en lugares de difícil acceso, por lo que se requiere de herramientas no invasivas que minimicen los efectos a organismos y/o poblaciones. Para esto se pueden utilizar herramientas que ayuden a predecir el comportamiento de oxidantes y antioxidantes en

diferentes tejidos de organismos, dependiendo del estado de reoxigenación y de su metabolismo. Una herramienta para estos estudios podría ser el uso de modelos matemáticos. Desde hace algunos años se han utilizado modelos matemáticos para conocer las adaptaciones metabólicas de organismos buceadores, para predecir la presión de nitrógeno (N_2) en sangre y tejidos durante buceos repetidos de mamíferos buceadores (Falhman et al., 2006), así como el tiempo de reoxigenación después de un buceo prolongado, dependiendo de la masa y el metabolismo del organismo (Falhman et al., 2006).

En las últimas décadas se ha tratado de usar la misma herramienta para conocer las alteraciones de rutas metabólicas por cambios en alguno de sus componentes. Holzhütter y colaboradores (1985) utilizan un modelo matemático para conocer el efecto de una deficiencia de piruvato kinasa en el metabolismo energético, y encuentran que los resultados del modelo pudieron ser comparados con datos experimentales de casos normales (sin deficiencia) y especialmente con casos de enzimopatía de la piruvato kinasa. Años más tarde, Schuster y Holzhütter (1995) propusieron el uso de modelos matemáticos para predecir los efectos metabólicos de alteraciones en la actividad enzimática en células rojas, para lo cual solo se consideraron como alteraciones enzimáticas los cambios en la concentración de las enzimas y modificaciones estructurales de las mismas. Los resultados de este estudio muestran que es posible predecir una alteración metabólica utilizando estas herramientas (Schuster y Holzhütter, 1995). Para estos estudios es necesario que se cuente con un número de muestras adecuado para realizar el modelo matemático (Schuster y Holzhütter, 1989; Mangel coms. pers., 2008).

Con todo lo anterior, se sugiere que el uso de modelos matemáticos podría ayudar a comprender de manera integral el papel de cada componente del sistema de protección antioxidante en mamíferos buceadores, y a diseñar un tratamiento médico en base a éstos antioxidantes y su importancia en la protección del organismo.

8. Conclusiones

La tasa de generación de O_2^- , los niveles de TBARS y carbonilos proteicos, y la actividad de las enzimas antioxidantes y el sistema GSH mostraron patrones similares en los tejidos analizados de kogias y delfines.

La protección antioxidante en órganos de kogias y delfines varía dependiendo de la importancia de estos para el nado, para el metabolismo de desechos metabólicos o para el funcionamiento del sistema nervioso central.

La actividad física, así como el comportamiento del buceo en delfines podrían estar reflejados en sus elevados niveles de TBARS y en la alta actividad de SOD y sus isoenzimas en comparación con los de kogias.

La dieta de las kogias a base de calamares podría actuar como un mecanismo de defensa antioxidante adicional en estos organismos, para evitar el daño oxidativo a lípidos.

Los indicadores de estrés oxidativo son una buena herramienta para clasificar organismos de acuerdo a sus capacidades de buceo.

La información de las defensas antioxidantes de organismos expuestos a constantes ciclos de isquemia-reperfusión podría ayudar a diseñar tratamientos medicinales para combatir enfermedades cardiovasculares, entre otras relacionadas con isquemia-reperfusión.

El uso de modelos matemáticos podría ayudar a reducir el número de muestras en estudios de este tipo, y a comprender de manera integral el papel de cada antioxidante en la defensa contra una excesiva producción de ERO.

9. Perspectivas

Los resultados encontrados en este trabajo muestran el papel que tienen las moléculas antioxidantes en la defensa contra ERO, en organismos expuestos a ciclos constantes de isquemia-reperfusión. Sin embargo, aun es necesario conocer más acerca de estas moléculas y su interacción con otros antioxidantes provenientes quizá de la dieta.

También sería conveniente profundizar en el papel que tienen los factores de transcripción como el NF- κ B o HIF-1, para la protección de órganos y tejidos durante el buceo en mamíferos marinos, y que dicha información sea relacionada con el tiempo de buceo y la etapa de reoxigenación en superficie, así como con la actividad de los antioxidantes y la producción de ERO.

El uso de modelos matemáticos en áreas de fisiología y metabolismo es un área relativamente nueva, sin embargo, debido a que se han encontrado resultados satisfactorios en estos estudios, se propone el desarrollo de un modelo matemático que ayude a conocer de manera integral las defensas antioxidantes en organismos sometidos a periodos de hipoxia-reoxigenación, con lo cual se pueda predecir el daño oxidativo ocurrido durante y después del buceo en un organismo buceador en determinadas condiciones.

10. Bibliografía

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- Andersen H.T. 1966. Physiological adaptations in diving vertebrates. *Physiol. Rev.* 46(2): 212-243.
- Anderson M.E. y Helmut S. 1996. Glutathione and Glutathione Delivery Compounds. *Adv. Pharmacol.* 38: 65-78.
- Andresen M., Regueira T. y Leighton F. 2006. Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Rev. Med. Chile* 134(5): 649-656.
- Archer F.I. 2002. Striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). In: Perrin, W. F., Würsig, B. & Thewissen J. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 1201-1203.
- Awasthi S., Gyurasics A., Knight S.A., Welty S.E. y Smith C.V. 1998. Protein oxidation biomarkers in hyperoxic lung injury in rats: effects of U-74389. *Toxicol. Lett.* 95(1): 47-61.
- Baird R.W. 2005. Sightings of Dwarf (*Kogia sima*) and Pygmy (*K. breviceps*) Sperm Whales from the Main Hawaiian Islands. *Pac. Sci.* 59(3): 461-466.
- Baird R.W., Nelson D., Lien J. y Nagorsen D.W. 1996. The status of the pygmy sperm whale, *Kogia breviceps*, in Canada. *Canad. Field-Natural.* 110(3): 525-532.
- Ballance L.T. 2002. Cetacean ecology. In: Perrin, W. F., Würsig, B. & Thewissen J. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 333-339.
- Barros N.B. y Wells R.S. 1998. Prey and Feeding Patterns of Resident Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Sarasota Bay, Florida. *J. Mammal.* 79(3): 1045-1059.
- Bartoli G.M. y Sies H. 1978. Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. *FEBS Lett.* 86(1): 89-91.
- Beatson E. 2007. The diet of pygmy sperm whales, *Kogia breviceps*, stranded in New Zealand: implications for conservation. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 17: 295-303.
- Behrisch H.W. y Elsner R. 1984. Enzymatic adaptations to asphyxia in the harbor seal and dog. *Respir. Physiol.* 55(2): 239-254.
- Blokhina O., Viroleinen E. y Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Ann. Botany* 91: 179-194.

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.
- Breese D. y Tershy B.R. 1993. Relative abundance of cetacea in the canal de ballenas, Gulf of California. *Mar. Mam. Sci.* 9(3): 319-324.
- Brites F.D., Evelson P.A., Christiansen M.G., Nicol M.F., Basílico M.J., Wikinski R.W. y Llesuy S.F. 1999. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin. Sci.* 96(4): 381-385.
- Butler P.J. 2001. Diving Beyond the Limits. *News Physiol. Sci.* 16: 222-227.
- Butler M., Bollens S., Burkhalter B., Madin L. y Horgan E. 2001. Mesopelagic fishes of the Arabian Sea: distribution, abundance and diet of *Chauliodus pammelas*, *Chauliodus sloani*, *Stomias affinis*, and *Stomias nebulosus*. *Deep-Sea Res. II* 48(6-7): 1369-1383.
- Cabrera M.E., Zhou L., Stanley W.C. y Saidel G.M. 2005. Regulation of Cardiac Energetics: Role of Redox State and Cellular Compartmentation during Ischemia. *Ann. NY Acad. Sci.* 1047(1): 259-270.
- Cardona-Maldonado M.A. y Mignucci-Giannoni A.A. 1999. Pygmy and Dwarf Sperm Whales in Puerto Rico and the Virgin Islands, with a Review of *Kogia* in the Caribbean. *Carib. J. Sci.* 35(1-2): 29-37.
- Carwardine M. 1995. Whales, dolphins and porpoises. Dorling Kindersley. Londres. 257 pp.
- Castellini M.A., Castellini J.M. y Rivera P.M. 2001. Adaptations to pressure in the RBC metabolism of diving mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 129A(4): 751-757.
- Cho, S.-Y., Dong-Sik Joo Heung-Gil Choi Eiichi Nara Kazuo Miyashita (2001). Oxidative stability of lipids from squid tissues. *Fish. Sci.* 67(4): 738-743.
- Costa D.P. 1999. The role of physiology in the behavior of diving mammals: insights from animals in nature. *EUBS 99 Proceedings 25th Annual Meeting Haifa and Eilat Israel*: 233-239.
- Costa D.P., Gales N.J. y Goebel M.E. 2001. Aerobic dive limit: how often does it occur in nature? *Comp. Biochem. Physiol.* 129A: 771-783.
- Dalle-Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R. y Milzani A. 2006a. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* 10(2): 389-406.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R. Giustarini D. y Milzani A. 2006b. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin. Chem.* 52(4): 601-623.

- Davis R.W., Fargion G.S., May N., Leming T.D., Baumgartner M., Evans W.E., Hansen L.J. y Mullin K. 1998. Physical habitat of cetaceans along the continental slope in the northcentral and western Gulf of Mexico. *Mar. Mam. Sci.* 14(3): 490-507.
- Di Mascio P., Murphy M.E. y Sies H. 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53(1): 194S-200.
- Drossos G., Lazou P., Panagopoulos P. y Westaby S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* 59: 169-172.
- Elsner R., Øyasæter S., Almaas R. y Saugstad O.D. 1998. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 199A: 975-980.
- Elsner R. 1999. Living in water, solutions to physiological problems. En: Reynolds III J.E. y Rommel S.A. (Eds.). *Biology of marine mammals*. Smithsonian Institution press. Washington, D.C. p 73-116.
- Elsner R. 2002. Cetacean physiology, Overview. En: Perrin W.F., Würsig B. y Thewissen J.G.M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 333-339.
- Fahlman A., Olszowka A., Bostrom B. y Jones D.R. 2006. Deep diving mammals: Dive behavior and circulatory adjustments contribute to bends avoidance. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 153(1): 66-77.
- Fernández-Casado M. 2000. El cachalote (*Physeter macrocephalus*). *Galemys* 12(2): 3-22.
- Flohé L.A. y Günzler W.A. 1984. Assays for glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 114-120.
- Foot N.J., Orgeig S. y Daniels C.B. 2006. The evolution of a physiological system: The pulmonary surfactant system in diving mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154(1-2): 118.
- Frank L. 1982. Protection from O₂ toxicity by preexposure to hypoxia: lung antioxidant enzyme role. *J. Appl. Physiol.* 53(2): 475-482.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Fuson A.L., Cowan D.F., Kanatous S.B., Polasek L.K. y Davis R.W. 2003. Adaptations to diving hypoxia in the heart, kidneys and splanchnic organs of harbor seals (*Phoca vitulina*). *J. Exp. Biol.* 206(22): 4139-4154.

- García-Hernández A., Herrera-Abarca J. y Ochoa J.L. 1999a. Effect of Superoxide Dismutase From Bovine Erythrocytes on Different Activity Parameters in Adjuvant-Induced Arthritis. *Arch. Med. Res.* 30: 132-137.
- García-Hernández A. y Ochoa J.L. 1999b. Anti-inflammatory activity of *Debaryomyces hansenii* Cu,Zn-SOD. *Arch. Med. Res.* 30: 69-73.
- García-López D., Hakkinen K., Cuevas M.J., Lima E., Kauhanen A., Mattila M., Sillanpaa E., Ahtiainen J.P., Karavirta L., Almar M. y González-Gallego J. 2007. Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 17(5): 595-604.
- Habig W. y Jakoby W. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77: 218-235.
- Haddad I.Y., Beckman J.S., Garver R.I. y Matalon S. 1994. Structural and Functional Alterations of Surfactant Protein A by Peroxynitrite. *Chest* 105: 84.
- Haddad J.J., Olver R.E. y Land S.C. 2000. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1alpha and NF-kappaB redox sensitivity: evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275: 21130-21139.
- Halasz N.A., Elsner R., Garvie R.S y Grotke G.T. 1974. Renal recovery from ischemia: a comparative study of harbor seal and dog kidneys. *Am. J. Physiol.* 227(6): 1331-1335.
- Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Nueva York. 851 pp.
- Hayes J.D., Flanagan J. U. y Jowsey I.R. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45(1): 51-88.
- Hermes-Lima M. y Storey K.B. 1993. Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 265(3): R646-652.
- Hermes-Lima M., Storey J.M. y Storey K.B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B: 437-448.
- Hermes-Lima M. y Zenteno-Savín T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C(4): 537-556.

- Hermes-Lima M. 2004a. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. En: Storey K.B. (Ed.) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. p 319-368.
- Hermes-Lima M. 2004b. Oxidative stress and medical sciences. En: Storey K.B. (Ed.) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. p 369-382.
- Hernández L.A. y Granger D.N. 1988. Role of antioxidants in organ preservation and transplantation. *Crit. Care Med.* 16(5): 543-549
- Hochachka P.W. y Storey K.B. 1975. Metabolic Consequences of Diving in Animals and Man. *Science* 187(4177): 613-621.
- Holzhütter, H.-G., Jacobasch G. y Bisdorff A. 1985. Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency. *Eur. J. Biochem.* 149(1): 101-111.
- Hung T.-H. y Burton G.J. 2006. "Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia Taiwanese J. Obstet. Gynecol. 45(3): 189-200.
- International Whaling Commission. 2008. Taxonomy of whales. Classification of the order of Cetacea (whales, dolphins and porpoises). En: <http://www.iwcoffice.org/conservation/cetacea.htm>
- Jackson R.M., Russell W.J. y Veal C.F. 1992. Endogenous and exogenous catalase in reoxygenation lung injury. *J. Appl. Physiol.* 72(3): 858-864.
- Jefferson T.A, Leatherwood S. y Webber M.A. 1993. *FAO Species identification guide. Marine mammals of the world*. UNEP / FAO. Rome. 320 pp.
- Ji L.L., Leeuwenburgh C., Leichtweis, S., Gore M., Fiebig R., Hollander J. y Bejma J. 1998. Oxidative Stress and Aging: Role of Exercise and Its Influences on Antioxidant Systems. *Ann. NY Acad. Sci.* 854(1): 102-117.
- Johnson P., Elsner R y Zenteno-Savín T. 2004. Hypoxia-Inducible Factor in Ringed Seal (*Phoca hispida*) Tissues. *Free Radic. Res.* 38(8): 847-854.
- Johnson P., Elsner R y Zenteno-Savín T. 2005. Hypoxia-inducible factor 1 proteomics and diving adaptations in ringed seal. *Free Radic. Biol. Med.* 39(2): 205-212.
- Jones D.P. 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8(9-10): 1865-1879.
- Jones S.P., Hoffmeyer M.R., Sharp B.R., Ho Y.-S. y Lefer D.J. 2003. Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 284(1): H277-282.

- Karihtala P. y Soini Y. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. 115(2): 81-103.
- Kanatous B.S., DiMichele L.V., Cowan D.F. y Davis R.W. 1999. High aerobic capacities in skeletal muscles of pinnipeds: adaptations to diving hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 86: 1247-1256.
- Kanatous S.B., Davis R.W., Watson R., Polasek L., Williams T.M. y Mathieu-Costello O. 2002. Aerobic capacities in the skeletal muscles of Weddell seals: key to longer dive durations? *J. Exp. Biol.* 205(23): 3601-3608.
- Kantha S.S. 1989. Carotenoids of edible molluscs; a review. *J. Food Biochem.* 13(6): 429-442.
- Kemp M., Go Y.-M. y Jones D.P. 2008. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Radic. Biol. Med.* 44(6): 921-937.
- Kevin L.G., Novalija E., Stowe D.F. 2005. Reactive Oxygen Species as Mediators of Cardiac Injury and Protection: The Relevance to Anesthesia Practice. *Anesth. Analg.* 101(5): 1275-1287.
- Kooyman G.L., Castellini M.A., y Randal R.W. 1981. Physiology of Diving in Marine Mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 43(1): 343-356.
- Kooyman G.L. 1989. Diverse divers: physiology and behavior. Springer-Verlag. Berlin. 200 p.
- Kooyman G.L. y Ponganis P. J. 1998. The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 19-32.
- Kooyman G.L. 2002. Diving Physiology. In: Perrin, W. F., Würsig, B. & Thewissen J. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 339-344.
- Koschier F.J., Elsner R.W., Holleman D.F. y Hong S.K. 1978. Organic anion transport by renal cortical slices of harbor seals (*Phoca vitulina*). *Comp. Biochem. Physiol.* 60(3): 289-292.
- Kubota R., Kunito T. y Tanabe S. 2001. Arsenic accumulation in the liver tissue of marine mammals. *Environ. Pollut.* 115(2): 303-312.
- Lang T.G. 1975. Speed, power, and drag measurement of dolphins and porpoises. In: Wu T.Y.T., Brokaw C.J. y Brennen C. (Eds). *Swimming and flying in nature*. Vol. 2. Plenum press. Nueva York. p 553-571.

- LeDuc R. 2002. Delphinids, overview. En: Perrin W.F., Würsig B. y Thewissen J.G.M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 310-314.
- Lesser M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68(1): 253-278.
- 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.
- Lew H., Pyke S. y Quintanilha A. 1985. Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett.* 185(2): 262-266.
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in neurons. *Physiol. Rev.* 79: 1431-1568.
- Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A. y Hermes-Lima M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280(1): R100-107.
- Lutz P.L. y Prentice H.M. 2002. Sensing and Responding to Hypoxia, Molecular and Physiological Mechanisms. *Integ. and Comp. Biol.* 42: 463-468.
- Matés J.M., Pérez-Gómez C. y Núñez-de Castro I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32(8): 595-603.
- Marnett L.J., Riggins J.N. y West J.D. 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* 111(5): 583-593.
- Marzan Y., Mora R., Butler A., Butler M. y Ingenito E.P. 2002. Effects of simultaneous exposure of surfactant to serum proteins and free radicals. *Exp. Lung Res.* 28(2): 99-121.
- McCord J.M. y Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244(22): 6049-6055.
- Meister A. y Anderson M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52(1): 711-760.
- Mendis E., Rajapakse N., Byun H.G. y Kim S.K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci.* 77(17): 2166-2178.
- Mortensen A., Skibsted L.H., Sampson J., Rice-Evans C. y Everett S.A. 1997. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett.* 418(1-2): 91-97.

- Murphy B., Zapol W.M. y Hochachka P.W. 1980. Metabolic activities of heart, lung, and brain during diving and recovery in the Weddell seal. *J. Appl. Physiol.* 48(4): 596-605.
- Nordberg J. y Arnér E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31(11): 1287-1312.
- Noren S.R. y Williams T.S. 2000. Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp. Biochem. Physiol. A* 126: 181-191.
- Noren S.R., Iverson S.J. y Boness D.J. 2005. Development of the Blood and Muscle Oxygen Stores in Gray Seals (*Halichoerus grypus*): Implications for Juvenile Diving Capacity and the Necessity of a Terrestrial Postweaning Fast. *Physiol. Biochem. Zool.* 78(4): 482-490.
- Ørtenblad N., Madsen K. y Djurhuus M.S. 1997. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 272(4): R1258-1263.
- Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Standman E.R., Liu G.J. Carney J.M. y Floyd R.A. 1990. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(13): 5144-5147.
- Perrin W.F. 2002. Common dolphins (*Delphinus delphis*, *D. capensis* and *D. tropicalis*). In: Perrin, W. F., Würsig, B. & Thewissen J. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 245-248.
- Persky A.M., Green P.S., Stublely L., Howell C.O., Zaulyanov L., Brzaeau G.A. y Simpkins J.W. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 223: 59-66.
- Rajapakse, N., Mendis E., Byun H.G. y Kim, S.W. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J. Nutr. Biochem.* 16(9): 562-569.
- Rahman I., Kode A. y Biswas, S.K. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protocols* 1(6): 3159-3165.
- Ridgway S.H. y Harrison R.J. 1986. Diving Dolphins. In: Bryden M.M., Harrison R.J. (Eds.). *Research on Dolphins*. Clarendon Press. Oxford. p 33-58.
- Ritter C., Andrades M.E., Reinke A., Menna-Barreto S., Moreira J.C. y Dal-Pizzol F. 2004. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit. Care Med.* 32(2): 342-349.

- Rumbold A., Duley L., Crowther C.A. y Haslam R.R. 2008. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. The Cochran library. John Wiley and sons. 112 pp.
- Sanders N.K. y Childress J.J. 1990. Adaptations to the Deep-Sea Oxygen Minimum Layer: Oxygen Binding by the Hemocyanin of the Bathypelagic Mysid, *Gnathophausia ingens* Dohrn. *Biol. Bull.* 178(3): 286-294.
- Santos M.B., Pierce G.J., Lopez A., Reid R.J., Rodoux V. y Mente E. 2006. Pygmy sperm whales *Kogia breviceps* in the northeast Atlantic: new information on stomach contents and strandings. *Mar. Mam. Sci.* 22(3): 600-616.
- Schuster R. y Holzhütter H.-G. 1995. Use of Mathematical Models for Predicting the Metabolic Effect of Large-Scale Enzyme Activity Alterations. *Eur. J. Biochem.* 229(2): 403-418.
- Schuster R., Jacobasch G. y Holzhütter H.-G. 1989. Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency: Energy and redox metabolism of glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 182: 605-612.
- Sen C.K. 1995. Oxidants and antioxidants in exercise. *J. Appl. Physiol.* 79(3): 675-686.
- Sen C.K., Atalay M. y Hanninen O. 1994. Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J. Appl. Physiol.* 77(5): 2177-2187.
- Sies H., Brigelius R. y Akerboom T.P.M. 1983. Intrahepatic glutathione status. In: Larsson, A., Orrenius S., Holmgren A. y Mannervik B. (Eds.). *Functions of glutathione: Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects.* Raven Press. Nueva York. p 51-64.
- Skrovan R.C., Williams T. M. Berry P.S., Moore P.W. y Davis R.W. 1999. The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). II. Biomechanics and changes in buoyancy at depth. *J. Exp. Biol.* 202(20): 2749-2761.
- Spragg R.G., Ponganis P.J., Marsh J.J., Rau G.A. y Bernhard W. 2004. Surfactant from diving aquatic mammals. *J. Appl. Physiol.* 96(5): 1626-1632.
- Stadtman E.R. y Levine R.L. 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.* 899: 191-208.
- Stephens P., Carbone C., Boyd I., McNamara J., Harding K. y Houston A. 2008. The Scaling of Diving Time Budgets: Insights from an Optimality Approach. *Amer. Nat.* 171(3): 305-314.
- Stewart B.S. 2002. Diving behavior. En: Perrin W.F., Würsig B. y Thewissen J.G.M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals.* Academic Press. San Diego. p 333-339.

- Suzuki K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: Taniguchi N, Gutteridge J (Eds.). *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press. Nueva York. p 91-95.
- Thewissen J.G.M. 2002. Musculature In: Perrin, W. F., Würsig, B. & Thewissen J. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 774-778.
- Urso M.L. y Clarkson P.M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189(1-2): 41-54.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M.T.D., Mazura M. y Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39: 44-84.
- Vázquez-Medina J., Zenteno-Savín T. y Elsner R. 2006 Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: Potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comp. Biochem. Physiol.* 142C: 198-204.
- Vázquez-Medina J.P., Zenteno-Savín T. y Elsner R. 2007. Glutathione protection against dive-associated ischemia/reperfusion in ringed seal tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 345: 110-118.
- Wells R.S. y Scott M.D. 2002. Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus* y *T. aduncus*). In: Perrin, W. F., Würsig, B. & Thewissen J. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 122-128.
- Weydert C.J., Waugh T.A., Ritchie J.M., Iyer K.S., Smith J.L. Li L., Spitz D.R. y Oberley L.W. 2006. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radic. Biol. Med.* 41(2): 226-237.
- White F.N., Ikeda M. y Elsner R.W. 1973. Adrenergic innervation of large arteries in the seal. *Comp. Gen. Pharm.* 4(15): 271-276.
- Whitehead H. 2002. Sperm whale In: Perrin, W. F., Würsig, B. & Thewissen J. G. M. (Eds.). *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego. p 333-339.
- Wilhem-Filho D., Sell F., Ghislandi M., Carrasquedo F., Fraga C.G., Wallauer J.P., Simoes-Lopes P.C. y Uhart M.M., 2002. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A: 885-892.
- Williams T.M., Haun J.E. y Friedl W.A. 1999a. The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). I. Balancing the demands of exercise for energy conservation at depth. *J. Exp. Biol.* 202(20): 2739-2748.

- Williams T.M., Noren D., Berry P., Estes J.A., Allison C. y Kirtland J. 1999b. The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). III. Thermoregulation at depth. *J. Exp. Biol.* 202(20): 2763-2769.
- Williams T.M., Zavanelli M., Miller M.A., Goldbeck R.A, Morledge M., Casper D., Pabst D.A., McLellan W., Cantin L.P. y Kliger D.S. 2008. Running, swimming and diving modifies neuroprotecting globins in the mammalian brain. *Proc. R. Soc. B* 275(1636): 751-758.
- Willis P.M. y Baird R.W. 1998. Status of the Dwarf Sperm Whale, *Kogia simus*, with special reference to Canada. *Canad Field-Natural.* 112(1): 114-125.
- Willmore W.G. y Storey K.B. 1997. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. *Am. J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 273(1): R219-225.
- Winterbourn C.C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4(5): 278-286.
- Zamocky M., Furtmuller P.G. y Obinger C. 2008. Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxid. Redox. Signal.* 10(9): 1527-1548.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. Nueva Jersey. 123 pp.
- Zenteno-Savín T. y Elsner R. 1998. Seals and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 25, S42.
- Zenteno-Savín T. y Elsner R. 2000. Differential oxidative stress in ringed seal tissues. *Free. Radic. Biol. Med.* 29, S139.
- Zenteno-Savín T. 2002. Oxidative stress in marine organisms: a review. En: Johnson P, Boldryev A A (Eds.). *Oxidative stress at molecular, cellular and organ levels*. Research Singpost. Kerala. p 67-76.
- Zenteno-Savín T., Clayton-Hernández E. y Elsner R. 2002. Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress? *Comp. Biochem. Physiol.* 133C: 527-536.

11. Anexos

Anexo 1. Actividad (Unidades por mg de proteína) de las enzimas antioxidantes en tejidos de delfines.

Tejidos	SOD (U/mg de prot.)	SOD-Mn (U/mg de prot.)	SOD-CuZn (U/mg de prot.)	CAT (U/mg de prot.)	GST (U/mg de prot.)	GPx (U/mg de prot.)	GR (U/mg de prot.)
Cerebro	1365.4 ± 321.19	1236.8 ± 299.6 ^a	584.68 ± 166.02	4.13 ± 1.14 ^a	7.37 ± 1.14 ^b	210.71 ± 60.58 ^{bcd}	42.94 ± 9.6 ^{bc}
Corazón	2463.5 ± 1441	884.28 ± 230.1 ^{ab}	574.13 ± 266.43	14.49 ± 2.32 ^c	20.02 ± 4.7 ^{ab}	233.16 ± 54.41 ^{bcd}	17.06 ± 2.6 ^b
Riñón	777.4 ± 138.23	475.58 ± 95.67 ^{ab}	300.91 ± 82.07	26.96 ± 7.83 ^{bc}	14.19 ± 4.63 ^{ab}	833.14 ± 254.3 ^{acd}	72.23 ± 8.65 ^a
Lat. dorsal	837.37 ± 163.98	493.6 ± 115.1 ^{ab}	548.28 ± 122.3	3.73 ± 0.9 ^a	6.64 ± 1.74 ^b	109.58 ± 26.22 ^b	32.26 ± 6.4b ^c
Hígado	690.93 ± 135.55	553.25 ± 111.88 ^{ab}	259.73 ± 81.26	35.61 ± 6.29 ^{bc}	31.25 ± 5.28 ^a	350.4 ± 78.42 ^{acd}	80.32 ± 11.3 ^a
Pulmón	603.44 ± 71.13	376.91 ± 66.85 ^b	302.55 ± 68.91	28.27 ± 16.52 ^{ac}	16.59 ± 9.92 ^b	454.7 ± 145.95 ^{acd}	60.67 ± 16.5 ^{ac}
Musc. pect.	634.31 ± 130.97	337.04 ± 63.45 ^{ab}	478.55 ± 142.91	2.25 ± 0.82 ^a	5.99 ± 1.3 ^b	113.86 ± 22.56 ^{bd}	33.15 ± 10.7 ^{bc}

SOD = superóxido dismutasa, SOD-Mn = SOD dependiente de manganeso, SOD-CuZn = SOD dependiente de cobre-zinc, CAT = catalasa, GST = glutatión S-transferasa, GPx = glutatión peroxidasa, GR = glutatión reductasa. Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados están expresados como media ± error estándar, n = 19. Las letras distintas denotan diferencias significativas; p < 0.05.

Anexo 2. Concentración de glutatión total (GSH-Eq = GSH + 2GSSG), glutatión disulfuro (GSSG), glutatión reducido (GSH) y proporción de GSSG:GSH-Eq, en tejidos de delfines.

Tejidos	GSH-Eq (nmol/g de tejido húmedo)	GSH (nmol/g de tejido húmedo)	GSSG (nmol/g de tejido húmedo)	GSSG:GSH-Eq
Cerebro	0.27 ± 0.04 ^{ab}	0.13 ± 0.04 ^b	0.08 ± 0.002 ^b	0.325 ± 0.024
Corazón	0.62 ± 0.1 ^a	0.46 ± 0.08 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.2 ± 0.02
Riñón	0.27 ± 0.05 ^b	0.154 ± 0.054 ^b	0.077 ± 0.003 ^b	0.325 ± 0.031
Lat. dorsal	0.49 ± 0.08 ^{ab}	0.31 ± 0.08 ^{ab}	0.09 ± 0.004 ^b	0.24 ± 0.03
Hígado	0.31 ± 0.05 ^b	0.18 ± 0.06 ^b	0.08 ± 0.004 ^b	0.312 ± 0.04
Pulmón	0.25 ± 0.04 ^b	0.13 ± 0.043 ^b	0.077 ± 0.001 ^b	0.33 ± 0.03
Musc. pect.	0.51 ± 0.09 ^{ab}	0.32 ± 0.08 ^{ab}	0.09 ± 0.004 ^b	0.24 ± 0.3

Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados están expresados como media ± error estándar. n = 19. Las letras distintas denotan diferencias significativas; p < 0.05.

Anexo 3. Actividad (Unidades por mg de proteína) de las enzimas antioxidantes en tejidos de kogias.

Tejidos	SOD (U/mg de prot.)	SOD-Mn (U/mg de prot.)	SOD-CuZn (U/mg de prot.)	CAT (U/mg de prot.)	GST (U/mg de prot.)	GPx (U/mg de prot.)	GR (U/mg de prot.)
Cerebro	741.77 ± 131.4 ^a	700.29 ± 171.19 ^a	188.21 ± 61.39 ^{ab}	6.63 ± 2.9 ^{bc}	7.5 ± 2.5 ^{ab}	201.28 ± 64.31 ^{ab}	18.27 ± 3.28 ^{ab}
Corazón	538.25 ± 94.53 ^{ab}	389.42 ± 71.92 ^{ab}	286.96 ± 118.9 ^{ab}	13.21 ± 3.8 ^{acd}	11.22 ± 3.31 ^{bc}	335.25 ± 78.13 ^{ac}	8.2 ± 2.3 ^b
Riñón	410.08 ± 83.97 ^{ab}	308.81 ± 88.69 ^{ab}	161.83 ± 39.45 ^{ab}	13.85 ± 2.56 ^{ad}	8.29 ± 2.71 ^{ab}	363.07 ± 86.56 ^a	33.4 ± 5.28 ^a
Lat. dorsal	438.13 ± 113.26 ^{ab}	300.02 ± 82.45 ^{ab}	479.67 ± 241.79 ^a	3.1 ± 0.81 ^b	2.8 ± 0.61 ^{ac}	121.12 ± 23.1 ^{bc}	8.19 ± 1.37 ^b
Hígado	215.17 ± 37.02 ^b	146.73 ± 37.25 ^b	55.28 ± 13.9 ^b	29.82 ± 5.82 ^a	19.98 ± 7.86 ^b	304.56 ± 82.51 ^{ab}	12.33 ± 3.55 ^b
Pulmón	197.99 ± 34.35 ^b	168.7 ± 37.89 ^b	54.01 ± 16.93 ^b	5.24 ± 1.06 ^{bd}	2.07 ± 0.58 ^a	259.68 ± 53.69 ^{ab}	11.83 ± 4.18 ^b
Musc. pect.	650.38 ± 195.2 ^{ab}	428.45 ± 117.39 ^{ab}	291.72 ± 142.42 ^{ab}	2.99 ± 0.8 ^b	3.67 ± 1.01 ^{ab}	128.9 ± 29.8 ^b	26.23 ± 12.9 ^{ab}

SOD = superóxido dismutasa, SOD-Mn = SOD dependiente de manganeso, SOD-CuZn = SOD dependiente de cobre-zinc, CAT = catalasa, GST = glutatión S-transferasa, GPx = glutatión peroxidasa, GR = glutatión reductasa. Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados están expresados como media ± error estándar, n = 11. Las letras distintas denotan diferencias significativas; p < 0.05.

Anexo 4. Concentración de glutatión total (GSH-Eq), glutatión disulfuro (GSSG), glutatión reducido (GSH) y proporción de GSSG:GSH-Eq, en tejidos de kogias.

Tejidos	GSH-Eq (nmol/g de tejido húmedo)	GSH (nmol/g de tejido húmedo)	GSSG (nmol/g de tejido húmedo)	GSSG:GSH-Eq
Cerebro	0.28 ± 0.03 ^{ab}	0.09 ± 0.03 ^{ab}	0.1 ± 0.007 ^{bc}	0.36 ± 0.03 ^{ab}
Corazón	0.8 ± 0.2 ^b	0.44 ± 0.17 ^a	0.18 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.03 ^{ab}
Riñón	0.23 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.002 ^b	0.37 ± 0.02 ^a
Lat. dorsal	0.52 ± 0.08 ^{ab}	0.23 ± 0.06 ^{ab}	0.14 ± 0.02 ^{ac}	0.3 ± 0.03 ^{ab}
Hígado	0.404 ± 0.072 ^{ab}	0.2 ± 0.08 ^{ab}	0.126 ± 0.015 ^a	0.31 ± 0.05 ^{ab}
Pulmón	0.37 ± 0.1 ^{ab}	0.21 ± 0.1 ^{ab}	0.11 ± 0.01 ^{b^c}	0.46 ± 0.15 ^{ab}
Musc. pect.	0.63 ± 0.12 ^b	0.41 ± 0.12 ^{ab}	0.13 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.03 ^b

Lat. dorsal= músculo lateral dorsal y Musc. pect.= músculo pectoral. Los resultados están expresados como media ± error estándar. n = 19. Las letras distintas denotan diferencias significativas; p < 0.05.