



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL METABOLISMO DE
PURINAS EN TRES ESPECIES DE MAMÍFEROS:
ACUÁTICO (*Mirounga angustirostris*),
SEMIACUÁTICO (*Lontra longicaudis annectens*) Y
TERRESTRE (*Sus scrofa*)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

MYRNA BARJAU PÉREZ MILICUA

La Paz, Baja California Sur, Junio de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:04 horas del día 4 del Mes de Junio del 2014, 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:

"ANÁLISIS COMPARATIVO DEL METABOLISMO DE PURINAS EN TRES ESPECIES DE MAMÍFEROS: ACUÁTICO (*Mirounga angustirostris* Gill, 1866), SEMIACUÁTICO (*Lontra longicaudis annectens* Major, 1897) Y TERRESTRE (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758)"

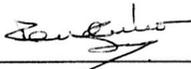
Presentada por el alumno:

Myrna Barjau Pérez Milicua

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
DIRECTOR DE TESIS



DR. DANIEL E. CROCKER
CO-TUTOR



DR. JUAN PABLO GALLO REYNOSO
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité Tutorial

Dra. Tania Zenteno Savín (Directora de tesis – CIBNOR, S.C)

Dr. Daniel E. Crocker (Co-tutor – Sonoma State University)

Dr. Juan Pablo Gallo Reynoso (Co-tutor – CIAD, A.C)

Comité Revisor de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín

Dr. Daniel E. Crocker

Dr. Juan Pablo Gallo Reynoso

Jurado de examen de grado

Dra. Tania Zenteno Savín

Dr. Daniel E. Crocker

Dr. Ramón Gaxiola Robles

Dr. Pedro Cruz Hernández (Suplente)

RESUMEN

Los mamíferos acuáticos y semiacuáticos tienen la capacidad para realizar buceos en apnea (cese de la respiración). El elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*) puede realizar buceos profundos y de larga duración; en un buceo rutinario puede permanecer en apnea aproximadamente 25 min, y cuando duerme durante su estancia en tierra exhibe apneas de 10 a 15 min. La nutria neotropical (*Lontra longicaudis annectens*) puede bucear durante 30 seg aproximadamente. Eventualmente, estos períodos de apnea resultan en isquemia (disminución del flujo de sangre oxigenada en tejidos) e hipoxia (disminución de la concentración de oxígeno). La producción de adenosin trifosfato (ATP) requiere de oxígeno, y la mayoría de las especies de mamíferos, como el cerdo doméstico (*Sus scrofa*) no están adaptadas a tolerar condiciones de hipoxia e isquemia que resultan en degradación de ATP. El objetivo de este trabajo fue explorar si existen diferencias en la actividad de las enzimas y en la concentración de nucleótidos y otras moléculas que intervienen en el metabolismo de purinas en eritrocitos, plasma y músculo de tres especies de mamíferos adaptadas a diferentes ambientes: acuático (elefante marino del norte) (n=11), semiacuático (nutria neotropical) (n=4) y terrestre (cerdo doméstico) (n=11). Se cuantificó, por espectrofotometría y cromatografía, la actividad de las enzimas purina nucleósido fosforilasa (PNP), xantina oxidasa (XO), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) e inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), y la concentración de hipoxantina (HX), inosina 5'-monofosfato (IMP), adenosina 5'-monofosfato (AMP), adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-trifosfato (ATP), guanosina 5'-difosfato (GDP), guanosina 5'-trifosfato (GTP), inosina, adenosina, ácido úrico y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). Se detectó mayor actividad de las enzimas PNP, HGPRT e IMPDH, así como mayor concentración de HX, IMP, AMP, ADP, ATP, GTP, inosina y NAD⁺ en eritrocitos y músculo de cerdo doméstico en comparación con elefante marino del norte y nutria neotropical. Estos resultados sugieren que, en condiciones basales (sin buceo, sin apnea del sueño), hay mayor reciclado y síntesis de purinas en el cerdo doméstico, y menor síntesis, degradación, reciclado, y por ende movilización, de purinas en elefante marino del norte y nutria neotropical.

ABSTRACT

Aquatic and semiaquatic mammals have the capacity to perform dives under apneas (breath holding). Northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) have the ability to perform deep and long duration dives; during a routine dive, adults can hold their breath for 25 min, and when they are sleeping on land they can hold their breaths from 10 to 15 min. Neotropical river otters (*Lontra longicaudis annectens*) can hold their breath for about 30 sec. Eventually, these periods of apnea result in ischemia (reduced blood supply to tissues) and hypoxia (reduced oxygen concentration). Production of adenosine 5'-triphosphate (ATP) requires oxygen, and most mammalian species, like the domestic pig (*Sus scrofa*), are not adapted to tolerate hypoxia and ischaemia, both of which result in ATP degradation. The objective of the present study was to explore the differences in enzymatic activity and nucleotide and other molecules concentrations that are involved in purine metabolism, in erythrocytes, plasma and muscle of three mammalian species adapted to different environments: aquatic (northern elephant seal) (n=11), semiaquatic (neotropical river otter) (n=4) and terrestrial (domestic pig) (n=11). Using spectrophotometric and chromatographic techniques, the enzymatic activity of purine nucleoside phosphorylase (PNP), xanthine oxidase (XO), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) and inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) was determined. Concentration of hypoxanthine (HX), inosine 5'-monophosphate (IMP), adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), ATP, guanosine 5'-diphosphate (GDP), guanosine 5'-triphosphate (GTP), inosine, adenosine, uric acid and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) were determined by HPLC. Results showed higher activity of PNP, HGPRT and IMPDH enzymes, and higher concentration of HX, IMP, AMP, ADP, ATP, GTP, inosine and NAD⁺, in erythrocytes and muscle of domestic pig than tissues of northern elephant seal and neotropical river otter. These results suggest that in basal conditions (without dive or sleep apnea), domestic pig has higher purine synthesis and salvage, while northern elephant seal and neotropical river otter have less purine synthesis, degradation, salvage and therefore, less purine mobilization.

DEDICATORIA

A mis padres, por todo el amor y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida. Por su inmensa confianza y paciencia, y por tener palabras de aliento cuando más las necesito. Como les dije cuando terminé la licenciatura, sin ustedes ningún logro a nivel personal y profesional sería posible.

A mi hermanito. Admiro tus ganas de triunfar y superarte día a día. No sólo eres una gran persona, sino un excelente arquitecto, dedicado y creativo. Gracias por inspirarme a ser el mejor yo que puedo ser y por siempre motivarme a pensar y actuar en grande.

A mis abuelos. Loyda, Ignacio, Armida y Luis. Aunque no están físicamente conmigo los recuerdo con mucho amor.

AGRADECIMIENTOS

A CIBNOR por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y a CONACYT por la beca otorgada (260513).

A las instituciones que financiaron el proyecto “Metabolismo de purinas en Mamíferos Marinos” del cual forma parte esta tesis: SEP-CONACYT (152784) y CIBNOR (PC2.0 y PC0.10).

A Departamento de Posgrado de CIBNOR por el apoyo para mi traslado a la ciudad de Guaymas, Sonora para realizar una estancia de investigación en Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD); por el traslado y hospedaje del Dr. Crocker para asistir a la defensa de tesis; por la impresión y empastado de las tesis; y por otorgar una beca complementaria para finalizar los estudios de maestría. De igual manera, agradezco a CONACYT por la beca mixta otorgada para realizar dicha estancia de investigación.

A mi directora de tesis. Tania, muchas gracias por aceptarme en tu grupo de trabajo, por la gran oportunidad de realizar esta tesis, por todo tu apoyo, confianza y paciencia a lo largo de estos casi tres años de conocernos, pero sobre todo por la amistad que me has brindado desde el inicio. No me queda más que darte el más sincero agradecimiento por hacer posible mi sueño de seguir trabajando con mamíferos marinos, por introducirme al mundo de la fisiología del buceo y los elefantes marinos y porque eres de las pocas personas que entiende mi pasión por trabajar con esos seres maravillosos.

A mis co-tutores:

Dr. Juan Pablo Gallo Reynoso, muchas gracias por creer en mi y por aceptar ser parte de mi comité tutorial; por recibirme en su laboratorio, por el apoyo bibliográfico sobre nutrias y por sus acertados comentarios.

Dr. Daniel E. Crocker, thank you so much because without your help there wouldn't be any northern elephant seals samples to work with in the first place. Also, thank you for

believing in my work, because even though we have never met in person (until now), you gave me a chance and accepted to be a part of my thesis committee.

Al personal del Laboratorio de Estrés Oxidativo. Orlando Lugo Lugo y Norma Olgúin por su apoyo técnico en la parte experimental de este trabajo. Gracias por su ayuda en la preparación de soluciones, compra de reactivos y estandarización de las técnicas. Orlando, gracias por tu ayuda con el HPLC y por tu disposición en esas largas jornadas de trabajo durante la estandarización y el procesamiento de las muestras.

A M.C. Roberto I. López Cruz. Robert, muchas gracias por tu ayuda en la estandarización de todas las técnicas, por acompañarme a la colecta de muestras de cerditos, y por coleccionar las primeras muestras de elefante marino (aunque no haya podido utilizarlas).

A Roberto Hernández por el acceso al Laboratorio de Bioquímica y por dejarnos utilizar el lector de microplaca.

A las personas e instituciones que hicieron posible la colecta de muestras:

Dr. Daniel Crocker, Dr. Jose Pablo Vázquez Medina y personal de la Universidad de California, Santa Cruz (UCSC) por proporcionarnos las muestras de sangre y músculo de elefante marino del norte. NMFS marine mammal permit #14636-02.

MVZ Alejandro de la Rosa y al personal del Acuario de Veracruz por proporcionarnos las muestras de sangre de nutrias neotropicales y por todo su apoyo y asesoría al respecto. Mención especial para Tina, Matías, Sofi y Marcelo por dejarse picar para que extrajeran su sangre. Son unas bellezas.

Al personal del rastro municipal de La Paz, BCS por permitirnos coleccionar la sangre y músculo de cerditos.

A todos y cada uno de los miembros del grupo de Estrés Oxidativo del CIBNOR: Tania, Arianna, Vanessa, Ramón, Orlando, Roberto, Norma, Marcela, Berenice, Iris, Priscila. Muchas gracias chicos por escuchar y criticar mis exposiciones, y por su apoyo en la realización de este trabajo.

Personal de Posgrado: Dra. Elisa Serviere Z., Lic. Osvelia Ibarra M., Tania Muñoz, Lic. Leticia Gonzalez Rubio R., Claudia Olachea L., y Horacio Sandoval por su amable trato, asesoría y apoyo técnico durante mis estudios de maestría.

Personal de Biblioteca del CIBNOR: María Esther Ojeda Castro, Susana Luna García y Ana María Talamantes Cota por su amable trato y ayuda en la búsqueda de libros y artículos durante mi estancia en CIBNOR.

Arianna y Vanessa (a.k.a Nenuquis). Muchas gracias por sus porras y consejos durante el desarrollo de este trabajo, pero sobretodo por brindarme su amistad y estar conmigo en las buenas y en las malas. Las quiero mucho!!

A todos y cada uno de los miembros del H. Canal Cultural: Milly, Joseline, Adriana, Iara, Mariana (encantadora de cerditos) y Sayayin. Muchas gracias por todo su apoyo y por este grupo tan padre que formamos desde nuestra novatada. Nunca olvidaré las fiestas y todos los momentos que compartimos. Los quiero mucho!!

A mi hermosa familia, papá, mamá y hermanito. Nunca me cansaré de expresarles lo agradecida que estoy por su inmenso apoyo y amor incondicional. Les dedico éste y todos los logros de mi vida. Los amo!!

GRACIAS TOTALES!!

CONTENIDO

Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Metabolismo de purinas.....	1
1.2 Adaptaciones al buceo.....	6
1.3 Elefante marino del norte.....	8
1.4 Nutria neotropical.....	11
1.5 Cerdo doméstico.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	20
5.1 General.....	20
5.2 Particulares.....	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
6.1 Colecta de muestras de sangre y músculo.....	21
6.2 Preparación de las muestras.....	22
6.2.1 Extractos de músculo esquelético.....	22
6.2.2 Contenido intraeritrocitario.....	22
6.3 Actividad enzimática.....	23
6.3.1 Purina nucleósido fosforilasa (PNP).....	23
6.3.2 Xantina oxidasa (XO).....	23
6.3.3 Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT).....	24
6.3.4 Inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH).....	24
6.4 Concentración de nucleótidos y metabolitos purínicos.....	25
6.5 Determinación de proteínas totales.....	26
6.6 Análisis estadísticos.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Muestras de sangre y músculo.....	27

7.2	Características de historia de vida de cada especie.....	27
7.3	Hematocrito.....	27
7.4	Actividad enzimática.....	28
7.4.1	Purina nucleósido fosforilasa (PNP).....	28
7.4.1.1	Comparación por especie entre tejidos.....	30
7.4.1.2	Comparación por tejido entre especies.....	30
7.4.2	Xantina oxidasa (XO).....	31
7.4.2.1	Comparación por especie entre tejidos.....	32
7.4.2.2	Comparación por tejido entre especies.....	32
7.4.3	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT).....	33
7.4.3.1	Comparación por especie entre tejidos.....	34
7.4.3.2	Comparación por tejido entre especies.....	34
7.4.4	Inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH).....	35
7.4.4.1	Comparación entre especies.....	35
7.5	Concentración de nucleótidos y metabolitos purínicos.....	36
7.5.1	Comparación por especie entre tejidos.....	37
7.5.2	Comparación por tejido entre especies.....	39
8.	DISCUSIÓN.....	52
8.1	Hematocrito.....	52
8.2	Actividad enzimática.....	54
8.2.1	Purina nucleósido fosforilasa (PNP).....	54
8.2.2	Xantina oxidasa (XO).....	55
8.2.3	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT).....	57
8.2.4	Inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH).....	58
8.3	Concentración de nucleótidos y metabolitos purínicos.....	58
9.	CONCLUSIONES.....	64
10.	RECOMENDACIONES.....	65
11.	LITERATURA CITADA.....	66
12.	ANEXO.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de purinas en mamíferos.....	4
Figura 2. Hematocrito (%) de las tres especies analizadas (cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte).....	28
Figura 3. Actividad de la enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP, U mg ⁻¹ proteína) en eritrocitos y músculo de cerdo doméstico y elefante marino del norte.....	30
Figura 4. Actividad de la enzima xantina oxidasa (XO, mU mg ⁻¹ proteína) en músculo y plasma de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	32
Figura 5. Actividad de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT, nmol mg ⁻¹ proteína h ⁻¹) en plasma y eritrocitos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	34
Figura 6. Actividad de la enzima inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH, nmol mg ⁻¹ proteína h ⁻¹) en eritrocitos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	36
Figura 7. Concentración de hipoxantina (HX, μM mg ⁻¹ proteína) en tejidos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	41
Figura 8. Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD ⁺ , μM mg ⁻¹ proteína) en tejidos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	42
Figura 9. Concentración de inosina 5'-monofosfato (IMP, μM mg ⁻¹ proteína) en tejidos de cerdo doméstico y nutria neotropical.....	43

Figura 10. Concentración de adenosina 5'-monofosfato (AMP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	44
Figura 11. Concentración de adenosina 5'-difosfato (ADP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	45
Figura 12. Concentración de adenosina 5'-trifosfato (ATP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	46
Figura 13. Concentración de guanosina 5'-difosfato (GDP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico y nutria neotropical.....	47
Figura 14. Concentración de guanosina 5'-trifosfato (GTP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico, elefante marino del norte y nutria neotropical.....	48
Figura 15. Concentración de inosina ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico y elefante marino del norte.....	49
Figura 16. Concentración de adenosina ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de elefante marino del norte y nutria neotropical.....	50
Figura 17. Concentración de ácido úrico ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de elefante marino del norte y nutria neotropical.....	51

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Características generales de las principales enzimas que intervienen en el metabolismo de purinas.....	5
Tabla II. Edad, peso, estilo de vida y dieta de las tres especies analizadas (cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte).....	27
Tabla III. Actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de purinas en tejidos de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte.....	29
Tabla IV. Concentración ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) de hipoxantina (HX), inosina 5'-monofosfato (IMP), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), adenosina 5'-monofosfato (AMP), adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-trifosfato (ATP), guanosina 5'-difosfato (GDP), guanosina 5'-trifosfato (GTP), inosina, adenosina y ácido úrico en tejidos de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte.....	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo de purinas

Los nucleótidos purínicos y sus productos metabólicos participan en diferentes procesos biológicos tanto en células procariotas como eucariotas (Carver, 1999; Pang *et al.*, 2012). Las purinas son componentes esenciales de los ácidos nucleicos (ARN y ADN), son una fuente de energía, y son precursores en la síntesis de cofactores nucleotídicos como la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), de mensajeros celulares como el adenosin monofosfato cíclico (AMPc), entre otros (Moffatt y Ashihara, 2002). Las purinas adenina, guanina e hipoxantina (HX) se sintetizan y degradan a través de un conjunto de reacciones bioquímicas conservadas entre los diferentes grupos de organismos, desde bacterias hasta mamíferos (Carver, 1999; Keebaugh, 2009) (Fig. 1).

Las purinas pueden ser sintetizadas dentro de las células por dos vías, *de novo* y reciclado. La síntesis *de novo* es similar en todos los organismos, y utiliza precursores simples como el dióxido de carbono (CO₂), cofactores como el N¹⁰-formil-tetrahidrofolato, y aminoácidos como glicina, glutamina y aspartato, para ensamblar el anillo purínico. La vía de síntesis *de novo* se compone de 10 reacciones enzimáticas que catalizan la conversión de 5'-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) a inosina 5'-monofosfato (IMP) (Buchanan, 1959; Adam, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Posteriormente, se realiza la conversión de IMP a nucleótidos de guanina y adenina por reacciones enzimáticas subsecuentes (Zhang *et al.*, 2008). En la síntesis de nucleótidos de guanina, el IMP es convertido a xantosina 5'-monofosfato (XMP) ($\text{IMP} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{XMP} + \text{NADH} + \text{H}^+$) por la acción de la enzima inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH, E.C. 1.1.1.205) (Tabla I), la XMP es convertida a guanosina 5'-monofosfato (GMP) por la enzima GMP sintetasa, y a partir de GMP se sintetizan guanosina 5'-difosfato (GDP) y guanosina 5'-trifosfato (GTP) (Sintchak y Nimmegern, 2000). En la síntesis de los nucleótidos de adenina, la enzima adenil-succinato sintetasa cataliza la conversión de IMP a adenil-succinato y éste se convierte a adenosina 5'-monofosfato (AMP), a partir del cual se sintetizan adenosina 5'-difosfato (ADP) y adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Van Der Weyden y Kelly, 1974). La

síntesis *de novo* no sólo tiene un costo energético, sino que también requiere oxígeno (O₂) (Zhang *et al.*, 2008).

En la síntesis de reciclado de purinas se utilizan bases preformadas procedentes de la degradación de ácidos nucleicos y nucleótidos en tejidos, o absorbidas de la dieta (Alexiou y Leese, 1992; Carver, 1999; Moriwaki *et al.*, 1999; Nyhan, 2005; Zhang *et al.*, 2008). En esta vía se utiliza una molécula de ATP (Murray, 1971), y la regulación depende de la disponibilidad de bases libres. Los nucleótidos como IMP, GMP y AMP pueden ser regenerados por la vía de reciclado de purinas (Carver, 1999; Zhang *et al.*, 2008). Esta vía permite que aquellos tejidos que tienen una capacidad limitada de llevar a cabo síntesis *de novo* puedan mantener sus niveles de purinas reutilizando bases obtenidas a través de la dieta (Cosgrove, 1998). Las enzimas que intervienen directamente en el reciclado de purinas se denominan fosforribosiltransferasas. Para los nucleótidos de guanina, la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT, E.C. 2.4.2.8) (Tabla I) utiliza las bases HX y guanina, y PRPP para la formación de IMP y GMP, respectivamente ($HX + PRPP = IMP + PPi$) (Stout y Caskey, 1985; Craig y Eakin, 2000). Mientras que para los nucleótidos de adenina la enzima adenina fosforribosiltransferasa (APRT, E.C. 2.4.2.7) utiliza la base adenina y PRPP para la formación de AMP (Stout y Caskey, 1985; Engle *et al.*, 1996).

Todos los organismos poseen la capacidad de sintetizar y degradar purinas; por una parte, los seres vivos dependen de los procesos catabólicos de compuestos orgánicos para la producción de energía a través de la oxidación de sus carbonos, y por otra parte, las purinas deben ser convertidas a productos finales que puedan ser fácilmente desechados (Balinsky, 1972; Werner y Witte, 2011).

La principal vía de degradación de purinas inicia con la conversión de IMP a inosina ($IMP + H_2O = inosina + Pi$) por la acción de la enzima 5'-nucleotidasa (5'-ND, E.C. 3.1.3.5). Esta enzima también cataliza la conversión de AMP a adenosina y GMP a guanosina (Moriwaki *et al.*, 1999). El segundo paso en el catabolismo de las purinas es la conversión de inosina a HX ($inosina + Pi = HX + \alpha\text{-D-ribose 1-fosfato}$), reacción que es catalizada por la enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP, E.C. 2.4.2.1) (Tabla I). Esta enzima también cataliza la conversión de adenosina a adenina, y de guanosina a guanina (Bzowska *et al.*,

2000; Keebaugh, 2009). Posteriormente, la HX es degradada a xantina (X) y ésta a ácido úrico por acción de la enzima xantina oxidoreductasa (XOR) (Tabla I). Casi todos los organismos presentan una forma nativa de esta enzima en forma de xantina deshidrogenasa (XDH, E.C. 1.17.1.4) que es dependiente de NAD^+ ($\text{HX} \text{ ó } \text{X} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} = \text{ácido úrico} + \text{NADH} + \text{H}^+$). Sin embargo, bajo condiciones de isquemia, la XDH puede convertirse a xantina oxidasa (XO, E.C. 1.17.3.2), que es dependiente de oxígeno ($\text{HX} \text{ ó } \text{X} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 = \text{ácido úrico} + \text{H}_2\text{O}_2$), mediante la oxidación reversible de grupos tiol o por proteólisis irreversible (Bradley *et al.*, 1996).

Dado que las purinas son sustancias relativamente insolubles, los organismos adaptados a diferentes ambientes presentan distintos metabolitos de desecho. Los productos finales del catabolismo de las purinas varían entre los diferentes grupos de vertebrados y han sido objeto de estudios comparativos desde principios del siglo XX (Balinsky, 1972; Keebaugh, 2009). En hominoideos, aves, reptiles y algunas especies de ranas, el producto final del metabolismo de purinas es el ácido úrico, debido a la pérdida de actividad de la enzima urato oxidasa (UOX, E.C. 1.7.3.3) durante la evolución de vertebrados terrestres (Keebaugh, 2009; Álvarez-Lario y Macarrón-Vicente, 2010). El resto de los mamíferos presenta actividad de UOX, pero han perdido la actividad de la enzima alantoinasa (ALLN) y, por lo tanto, tienen como producto final del metabolismo de purinas a la alantoína (Schmidt-Nielsen, 1997; Keebaugh, 2009; Álvarez-Lario y Macarrón-Vicente, 2010).

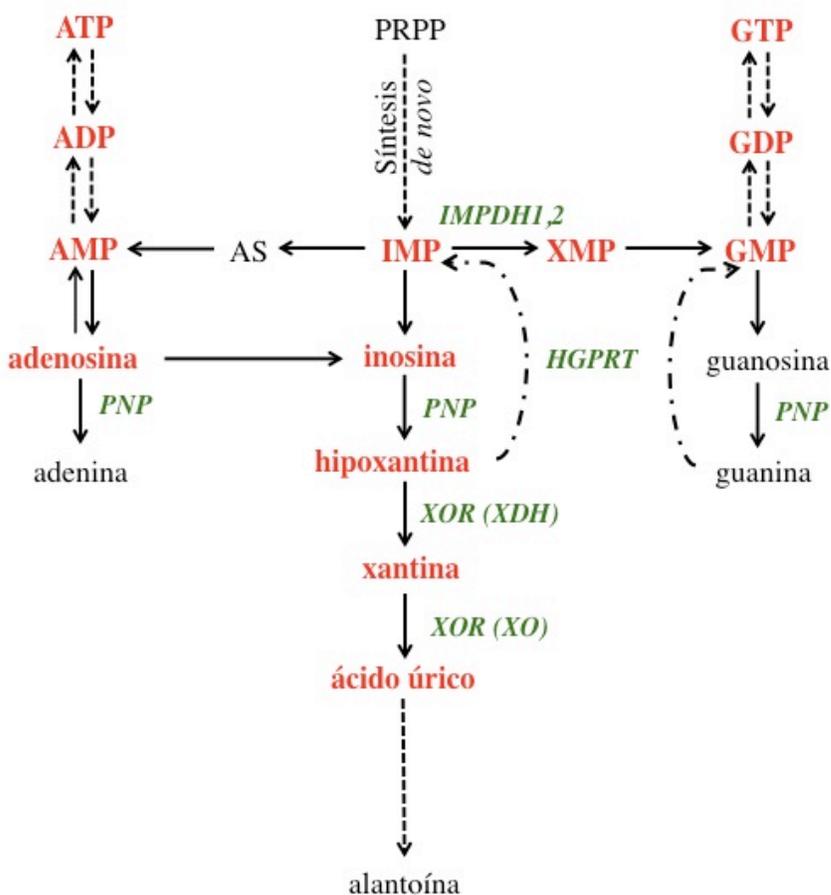


Figura 1. Metabolismo de purinas en mamíferos. Las enzimas analizadas en este trabajo: purina nucleósido fosforilasa (PNP), xantina oxidasa (XO), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) e inosina monofosfatos deshidrogenasa (IMPDH), se resaltan en verde. Los metabolitos: inosina 5'-monofosfato (IMP), inosina, hipoxantina (HX), xantina, ácido úrico, adenosina 5'-monofosfato (AMP), adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-trifosfato (ATP), guanosina 5'-difosfato (GDP), guanosina 5'-trifosfato (GTP) y adenosina, se resaltan en rojo (tomado y traducido de Keebaugh, 2009).

Tabla I. Características generales de las principales enzimas que intervienen en el metabolismo de purinas, nombre de la enzima; vía metabólica en la que interviene; reacción que cataliza; localización en células, tejidos y órganos.

Enzima	Vía metabólica	Reacción	Localización
PNP E.C. 2.4.2.1	Catabolismo	Cataliza el enlace glucosídico de ribo- y desoxirribonucleósidos en presencia de fosfato inorgánico generando una base purínica y una ribosa(desoxirribosa)-1-fosfato.	En el citoplasma de muchos organismos procariotas y eucariotas. En mamíferos, sólo en ciertos tejidos: corazón, hígado, pulmón, riñón, cerebro, epitelio ciliado, leucocitos, intestino delgado.
XOR XDH, E.C. 1.17.1.4; XO, E.C. 1.17.3.2	Catabolismo	La XDH cataliza la oxidación de bases purínicas como la HX y xantina, utilizando NAD^+ como sustrato. La XO, cataliza la oxidación de las mismas bases pero utiliza oxígeno como sustrato. Ambas enzimas utilizan agua durante sus reacciones.	En el citoplasma de células endoteliales y epiteliales. En el exterior de la membrana de células endoteliales. Desde bacterias hasta mamíferos. En estos últimos, se distribuye ampliamente en tejidos como hígado, intestino, sangre, corazón, pulmón y músculo esquelético. Se ha reportado XO circulante, particularmente en plasma de humanos.
HGPRT E.C. 2.4.2.8	Reciclado	Cataliza una reacción de transferencia, utilizando ribosa (proporcionada por PRPP) y una base nitrogenada (HX ó guanina). Primero se une a PRPP y después a la base. Una vez que se hace la transferencia, la enzima se disocia del nucleótido recién formado, al mismo tiempo que se libera pirofosfato.	En el citoplasma de células procariotas y eucariotas. En todos los tejidos somáticos, y en sistema nervioso central. Se ha purificado en humano, hámster, ratón, rata, levadura, parásitos.
IMPDH E.C. 1.1.1.205	Síntesis <i>de novo</i>	Cataliza una reacción de oxidación utilizando como sustratos a IMP y NAD^+ para producir XMP. En humanos, presenta un sitio activo de cisteína el cual forma un enlace covalente con el anillo purínico.	En células procariotas y eucariotas. Con excepción de dos especies de protozoarios, parece estar presente en todos los organismos.

PNP, purina nucleósido fosforilasa; XO, xantina oxidasa; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa; IMPDH, inosina monofosfato deshidrogenasa; XDH, xantina deshidrogenasa; HX, hipoxantina; NAD^+ , nicotinamida adenin dinucleótido; XO, xantina oxidasa; PRPP, 5'-fosforribosil-1-pirofosfato; IMP, inosina 5'-monofosfato; XMP, xantosina 5'-monofosfato. (Información tomada de Stout y Caskey, 1985; Moriwaki *et al.*, 1999; Bzowska *et al.*, 2000; Craig y Eakin, 2000; Sintchak y Nimmesgern, 2000; Čejková *et al.*, 2002; Harrison, 2002; Hedstrom, 2009).

1.2 Adaptaciones al buceo

Una de las funciones de los nucleótidos de purinas es que, a través de la hidrólisis de sus grupos fosfato, se obtiene la energía necesaria para el mantenimiento del metabolismo celular. El nucleótido ATP es la moneda energética universal en todos los sistemas biológicos y actúa en numerosas reacciones enzimáticas involucradas en la transferencia de energía química (Janssen, 1993; Cosgrove, 1998; Hochachka y Somero, 2002).

El oxígeno es indispensable para la vida de la mayoría de los seres vivos debido a que la producción de ATP en la mitocondria está ligada a la disponibilidad de oxígeno (Storey, 1996). Sin embargo, cuando disminuye la concentración de oxígeno (hipoxia) o en condiciones de ausencia total de oxígeno (anoxia), no se puede generar ATP a partir de ADP, por lo que éste es degradado y se inicia una cascada catabólica de purinas resultando en la acumulación de metabolitos en células y tejidos (Janssen, 1993).

En general, los mamíferos poseen una tolerancia nula o limitada a la falta de oxígeno, por lo que sus células y tejidos se ven comprometidos durante episodios prolongados de hipoxia (Boutilier y St-Pierre, 2000). Sin embargo, existen especies de mamíferos, como el elefante marino y el cachalote, que toleran períodos prolongados de hipoxia, asociados al cese de la respiración (apnea) como consecuencia del buceo (Elsner, 1999). Estas especies poseen adaptaciones bioquímicas, fisiológicas y anatómicas específicas que les han permitido habitar en ambientes acuáticos (Elsner, 1999; Wilhelm Filho *et al.*, 2002). Dichas adaptaciones han sido estudiadas en mamíferos marinos (particularmente en focas), por su capacidad de apnea y tolerancia a la hipoxia. Existen tres mecanismos fisiológicos que se conocen en conjunto como la “respuesta al buceo” y que son comunes en todos los mamíferos (acuáticos, semiacuáticos y terrestres) (Panneton, 2013). La *apnea* ocurre al iniciar la inmersión; a través de una estimulación del sistema nervioso parasimpático se produce una disminución del ritmo cardíaco (*bradicardia*) y a través del estímulo del sistema nervioso simpático se induce una *vasoconstricción periférica* masiva que reduce el flujo sanguíneo a órganos periféricos tolerantes a la hipoxia (piel, músculo, riñón, hígado) y desvía la sangre oxigenada a los tejidos que son más sensibles a condiciones de hipoxia (cerebro, sistema nervioso) (Elsner, 1999; Castellini y Castellini, 2004; Panneton, 2013).

A diferencia de los humanos (que llenamos nuestros pulmones de aire antes de una inmersión), los mamíferos marinos vacían hasta un 50% sus pulmones, por lo que éstos no son una fuente importante de oxígeno durante los buceos (menor al 5% del total de oxígeno) (Kooyman, 2002; Panneton, 2013). En vertebrados (mamíferos y aves) que bucean, el volumen sanguíneo es tres veces mayor, la concentración de hemoglobina (Hb) es aproximadamente 9.5 veces mayor, y la concentración de mioglobina (Mb) es de 10 a 30 veces mayor que en vertebrados no buceadores (Kooyman y Ponganis, 1998; Kooyman, 2002). Por lo tanto, la principal reserva de oxígeno (80 a 90% del O₂ total) en mamíferos buceadores se encuentra en la sangre asociada a la Hb y en el músculo asociado a la Mb. Los mamíferos que bucean por períodos más prolongados, por ejemplo los elefantes marinos *Mirounga* spp., tienen reservas de oxígeno mayores (casi 100 mL O₂ kg⁻¹ de masa corporal) que en humanos (20 mL O₂ kg⁻¹ de masa corporal). Esta reserva de oxígeno permite mantener un metabolismo aeróbico durante los buceos; sin embargo, cuando este almacén se agota, es decir, sangre y tejidos se tornan hipóxicos, aumenta la concentración de CO₂ (hipercapnia) y eventualmente se acumulan productos del metabolismo anaeróbico, lactato y iones hidrógeno (acidosis). La combinación de hipoxia, hipercapnia y acidosis se conoce como *asfixia* (Elsner, 1999). Al punto en que inicia la acumulación de lactato se conoce como límite de buceo aeróbico (Kooyman *et al.*, 1980; Panneton, 2013). El lactato acumulado es removido de los tejidos a través del restablecimiento del flujo sanguíneo (reperfusión) cuando se restaura la respiración en la superficie una vez que termina el buceo (Castellini y Castellini, 2004).

Los mamíferos buceadores también cuentan con adaptaciones morfológicas que les permiten habitar ecosistemas acuáticos. Las costillas y tráquea están menos calcificadas, lo que disminuye su rigidez; los alveólos y los bronquiolos carecen de soporte cartilaginoso (Thornton y Hochachka, 2004), y los surfactantes de mamíferos buceadores tienen una composición de lípidos diferente a la de mamíferos terrestres, que les confiere una función antiadhesiva en los pulmones, probablemente es una adaptación funcional resultado del constante colapso pulmonar por los buceos (Miller *et al.*, 2006). Lo anterior favorece la compresión de la caja torácica y los pulmones por el incremento en la presión hidrostática durante los buceos.

Durante los buceos, el *hematocrito* (Hct) (porcentaje volumétrico de eritrocitos en la sangre), aumenta en comparación con los valores en eupnea (respiración normal) en focas (Kooyman *et al.*, 1980; Castellini *et al.*, 1988; Zapol *et al.*, 1989). Se ha sugerido que el *bazo* actúa como una reserva dinámica de eritrocitos que se liberan a la circulación durante los buceos (Thornton *et al.*, 2001). La contracción del bazo ocurre por la estimulación del nervio trigémino (que causa bradicardia, vasoconstricción periférica y contracción de la vena cava) y por un incremento en los niveles de catecolaminas circulantes (Zapol, 1987; Thornton y Hochachka, 2004).

La duración y profundidad de los buceos difiere entre las especies de mamíferos buceadores. La foca anillada (*Phoca hispida*) y el lobo marino de california (*Zalophus californianus*) bucean a profundidades menores a 120 m y por períodos de 4 a 5 min (Kooyman, 1989; Kelly y Wartzok, 1996). Otras especies, como los elefantes marinos, poseen la capacidad de bucear hasta 2000 m de profundidad (Stewart y DeLong, 1994; McIntyre *et al.*, 2010). Sin embargo, estos buceos profundos no necesariamente son los más largos en duración. El elefante marino del sur (*Mirounga leonina*) realiza buceos rutinarios de 20 min (Hindell *et al.*, 2000) y se han registrado buceos extremos de 120 min de duración (Hindell *et al.*, 1991). La foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*), aunque es capaz de bucear hasta 82 minutos (Castellini *et al.*, 1992a), realiza buceos rutinarios de 10 a 20 min cuando busca alimento entre los 50 y 600 m de profundidad (Castellini *et al.*, 1992b). La foca capuchina (*Cystophora cristata*) realiza la mayoría de sus buceos (75%) en profundidades de 100 a 600 m y con duración de 5 a 25 min, aunque es capaz de bucear a profundidades mayores a 1016 m y por más de 52 min (Folkow y Blix, 1999).

1.3 Elefante marino del norte

Los elefantes marinos (*Mirounga* spp.) pertenecientes a la familia Phocidae son de las especies de mayor tamaño dentro de las 34 especies de pinnípedos (Orden Carnivora) que existen actualmente (Le Boeuf y Laws, 1994). El elefante marino del norte (*M. angustirostris*) es una especie con un marcado dimorfismo sexual, siendo los machos más grandes que las hembras; los machos adulto pueden alcanzar hasta 4 m de longitud y pesar hasta 2 toneladas, mientras que las hembras alcanzan los 3 m de longitud y 600 kg de peso

(Reeves *et al.*, 1992). Las crías recién nacidas miden aproximadamente 125 cm de longitud y pesan 35 kg, mientras que una cría recién destetada puede medir 145 cm de longitud y alcanzar un peso de 200 kg en 3 a 4 semanas, que es el tiempo que dura la lactancia y atención maternal (Reeves *et al.*, 1992). Otras características distintivas de los machos de elefante marino del norte son la probóscide de los adultos y una piel gruesa y rugosa en la zona del cuello y pecho (Reeves *et al.*, 1992).

El elefante marino del norte se distribuye a lo largo de la costa oeste de Norteamérica, en islas y costas de la península de Baja California, en México, y de California, en Estados Unidos de América (EUA) (Reeves *et al.*, 1992; LeBoeuf y Laws, 1994). Esta especie fue objeto de caza con fines comerciales por su piel y grasa desde 1818 hasta 1860, y se presumió extinta en 1892; sin embargo, algunos organismos fueron descubiertos en Isla Guadalupe, localizada en aguas mexicanas al noroeste de Baja California (Reeves *et al.*, 1992). Aunque algunos de esos organismos se cazaron para colecciones científicas, a partir de 1911 el gobierno mexicano prohibió su caza y decretó a la Isla Guadalupe como parque nacional (Reeves *et al.*, 1992; Gallo-Reynoso y Hoyos-Padilla, 2011). A partir de entonces, la población de elefante marino del norte se ha incrementado exponencialmente, alcanzando aproximadamente los 130000 individuos, y se han establecido colonias tanto en aguas estadounidenses (Santa Barbara, San Nicolas, San Miguel, Santa Rosa, Año Nuevo y sureste de las islas Farallon) como en aguas mexicanas (Isla Guadalupe, San Benito y Cedros) (Reeves *et al.*, 1992). Por ende, la población sufrió varios cuellos de botella, resultando en baja variabilidad genética (Hoelzel, 1999; Weber *et al.*, 2004; Gallo-Reynoso y Hoyos-Padilla, 2011).

El elefante marino del norte se caracteriza por realizar dos migraciones anuales, en las que recorren una distancia de 18000 a 21000 km (las más extensas reportadas para un mamífero) (Stewart y DeLong, 1995). Dichos viajes son con fines de alimentación. Al término de la temporada reproductiva (febrero), machos y hembras adultos dejan la colonia para realizar un viaje de alimentación, migrando hacia el Pacífico Norte, los machos llegan hasta el Golfo de Alaska, mientras que las hembras prefieren zonas más cercanas como Oregon y Washington (Reeves *et al.*, 1992; Le Boeuf *et al.*, 1993; Stewart and DeLong, 1994). Posteriormente, los elefantes marinos regresan a las colonias donde se reprodujeron,

con fines de descanso y muda de piel y pelaje; las hembras regresan de 60 a 85 días después de la temporada reproductiva, mientras que los machos regresan después de 100 a 120 días (Stewart y DeLong, 1995). El proceso de muda es vital para desechar compuestos tóxicos como el amoníaco, que se ha acumulado en su piel y pelaje como resultado de su dieta basada en peces y cefalópodos de profundidad (Gallo-Reynoso y Hoyos-Padilla, 2011). La muda dura aproximadamente tres a cuatro semanas y se lleva a cabo en diferentes temporadas, de acuerdo a la edad y sexo de los individuos; las hembras adulto y los juveniles (de uno a cuatro años de edad) regresan a las colonias en primavera (desde inicios de marzo hasta mayo) para la muda, mientras que los machos subadulto y adulto realizan su muda en verano (junio-agosto) (Worthy *et al.*, 1992; Gallo-Reynoso, comunicación personal). Durante el otoño (septiembre-noviembre), los juveniles de menos de un año (aproximadamente ocho meses) (denominados en inglés como “young of the year” o “returning pups” o “yearling”) (Crocker, D., comunicación personal) regresan a las colonias para descansar después de su primer viaje de alimentación post-destete; aunque algunos de estos juveniles exhiben una ligera muda (“scabby molt”), la muda de piel y pelaje se realiza hasta la primavera (Le Boeuf y Laws, 1994). Al finalizar la temporada de muda, los elefantes marinos regresan a las zonas de alimentación en un segundo viaje (post-muda) que dura 125 días en machos y 240 días en hembras (Reeves *et al.*, 1992). Durante estos viajes, los elefantes marinos permanecen sumergidos 90% del tiempo (Le Boeuf *et al.*, 1996) y se alimentan constantemente ganando peso antes de regresar a las colonias a reproducirse. Las hembras (fecundadas desde la temporada anterior) empiezan a arribar a las colonias a finales de diciembre, y seis ó siete días después de su llegada inician los nacimientos. Los machos también arriban en esas fechas e inician los enfrentamientos (despliegues vocales y físicos) con otros machos para establecerse como el macho alfa, establecer territorios y ganar el derecho a tener el control de un harén de hembras (con las cuales se apareará) (Gallo-Reynoso y Hoyos-Padilla, 2011). Durante la temporada de apareamiento y nacimientos, las hembras permanecen en tierra durante 34 días, mientras que los machos permanecen hasta 60 días en su papel de macho alfa; en esta etapa, los elefantes marinos no se alimentan, es decir, ayunan, dedicando toda su energía a la reproducción y cuidado de las crías (Gallo-Reynoso y Hoyos-Padilla, 2011). Las hembras

destetan a sus crías de tres a cuatro semanas después del parto, y dejan la colonia, iniciando su viaje de alimentación post-reproductiva (Le Boeuf *et al.*, 1972).

Durante los viajes de alimentación (post-reproducción y post-muda), tanto hembras como machos adulto, se caracterizan por bucear continuamente, realizando buceos reportados a profundidades de más de 250 m de profundidad con duración de 21 a 25 min e intervalos de 6 a 8 min en superficie para respirar durante dichos viajes. Estas migraciones verticales abarcan 6800 km en el caso de machos y 9000 km en el caso de hembras (Stewart y DeLong, 1995). Durante su estancia en tierra, el elefante marino del norte al igual que otras especies de focas realizan apneas espontáneas (de hasta 20 min en el caso del elefante marino) mientras duermen (Castellini *et al.*, 1988). Esta *apnea del sueño* es un proceso natural en focas y comprenden hasta 60% del tiempo que permanecen dormidas (Blackwell y LeBoeuf, 1993). Durante los períodos de apnea del sueño, las focas experimentan contracción del bazo y un consecuente aumento de Hct, de manera similar a lo que ocurre durante las apneas del buceo (Castellini *et al.*, 1986). Se ha reportado que una cría de elefante marino del norte puede dormir 30 a 40 min, durante los cuales realiza apneas de 10 min seguidos de eupneas de dos a tres minutos. Además, el elefante marino del norte puede realizar apneas cuando están despiertos; sin embargo, éstas son de menor duración (aproximadamente cinco minutos) (Castellini, 1994). La duración de la apnea del sueño aumenta desde el nacimiento hasta la edad adulta, sugiriendo una relación directamente proporcional entre la edad y la capacidad de buceo (Blackwell y Le Boeuf, 1993). Otros aspectos similares entre la apnea del sueño y la apnea del buceo incluyen bradicardia (Bartholomew, 1954; Huntley, 1984), aumento de los niveles de Hct (Castellini *et al.*, 1986), cambios en la circulación en tejidos periféricos (Castellini, 1986), disminución de la concentración de oxígeno en la sangre, aumento en los niveles de CO₂ y acidosis (Kooyman *et al.*, 1980). Por ello, se considera a la apnea del sueño como un pre-acondicionamiento que prepara a los fócidos para el buceo, desde su nacimiento (Castellini, 1994).

1.4 Nutria neotropical

Los mamíferos poseen características y adaptaciones dependiendo del ambiente que habitan. Muchas especies de mamíferos viven en asociación parcial o total con el ambiente

acuático y, dado que respirar aire es una característica de los mamíferos, algunas especies han desarrollado un estilo de vida anfibio, es decir, habitan tanto el ambiente acuático como el terrestre sin estar completamente adaptadas a ninguno de los dos (Dunstone, 1998). Estas especies, incluyendo la nutría neotropical, se denominan *semiacuáticas* y ocupan una posición intermedia entre los mamíferos terrestres y los acuáticos (Fish y Baudinette, 1999). Aunque los pinnípedos pueden habitar el ambiente terrestre para ciertas actividades como la reproducción y en algunos casos la muda de pelaje, no son considerados como mamíferos semiacuáticos ya que habitan la mayor parte de su vida en el ambiente marino y dependen completamente de éste para su alimentación (Dunstone, 1998; Gallo-Reynoso y Hoyos-Padilla, 2011). Los mamíferos semiacuáticos representan la etapa intermedia del proceso de adaptación de mamíferos terrestres al ambiente acuático (Estes, 1989; Fish, 1993), se encuentran en una posición energéticamente precaria (Fish y Baudinette, 1999) y el desempeño energético en ambos ambientes es limitado, ya que su anatomía y fisiología han sido modificadas para contrarrestar los retos de moverse en agua y en tierra (Fish, 2000). Por ejemplo, a pesar de su actividad acuática, las extremidades de los mamíferos semiacuáticos sólo han sido modificadas ligeramente (en comparación con aquellas de los mamíferos acuáticos) y las utilizan tanto para propulsión en el agua como para caminar en tierra (Fish, 2000).

Los mamíferos semiacuáticos son filogenéticamente muy diversos y sus representantes se encuentran en varios linajes de mamíferos (Marsupialia, Rodentia, Monotremata, Carnivora, entre otros) (Dunstone, 1998). Una de las familias de mamíferos semiacuáticos más conocidas es la Mustelidae, perteneciente al orden Carnivora. Ésta cuenta con 67 especies que habitan las inmediaciones de ríos, lagos, y mares. Las nutrias de río y nutrias marinas (subfamilia Lutrinae) son especies importantes en la estructura de comunidades de ríos, lagos y costas, y han sido objeto de caza y comercialización por su piel (Marmi *et al.*, 2004; Mason y McDonald, 2008).

La nutria neotropical (*Lontra longicaudis annectens* Major, 1897) es de cuerpo fusiforme, adaptada al buceo. Sus extremidades son cortas y robustas, y poseen membranas interdigitales que ayudan a la propulsión bajo el agua (Emmons, 1990; Gallo-Reynoso, 2008). La nutria neotropical presenta dimorfismo sexual, siendo los machos 20 a 25% más

grandes que las hembras; su longitud total puede alcanzar hasta 1.32 m (Gallo-Reynoso, 2008). Tiene una cola larga y gruesa que llega a ocupar del 38 al 40% de la longitud total del animal, siendo más larga en machos (53 cm) que en hembras (42 cm) (Parera, 1996; Gallo-Reynoso, 2008). Esta especie tiene una distribución amplia (en comparación con sus especies congéneres) y se distribuye desde el noroeste de México hasta Sudamérica (Argentina) (Redford y Eisenberg, 1992). Es la especie más ampliamente distribuida y mejor conocida en México y se encuentra en todos los ríos grandes y medianos, ríos de planicies costeras y arroyos de montaña (Gallo-Reynoso, 1997). Su piel presenta dos capas de pelo, el *inferior* o “lanugo” (muy denso y suave) atrapa burbujas de aire y funciona como aislante térmico permitiéndole al animal permanecer mojado por horas sin que la piel entre en contacto con el agua, y el *pelo de “guardia”* que es más grueso y más largo, con diferente longitud y color en cada parte del cuerpo, es el pelo normal de todo mamífero, que le da la coloración y brillo característico a las nutrias (Kenyon, 1969; Bertonatti y Parera, 1994; Gallo-Reynoso, 2008). Las nutrias no poseen capa de grasa subcutánea (*blubber*) como los mamíferos marinos se estima que sólo el 3% del peso corporal de una nutria es grasa, y se sugiere que la presencia de una capa de grasa les implicaría desventajas en tierra, particularmente al caminar. Por lo tanto, el pelaje denso (aproximadamente 50000 pelos por cm²) es el principal aislante térmico en los mustélidos (Kruuk, 1995). La capa de aire atrapada entre el pelaje inferior les provee flotabilidad positiva que impide que asuman una posición vertical en el agua, evitando así un incremento en el arrastre hidrodinámico durante el nado, lo que contribuye significativamente al gasto energético en mamíferos semiacuáticos en comparación con mamíferos marinos (Dunstone, 1998).

Las nutrias neotropicales se alimentan de una variedad de especies, pero no tienen una dieta típica; son oportunistas y sus preferencias dietéticas dependen de la abundancia local de peces, crustáceos, mamíferos, aves, réptiles, anfibios e insectos, que pueden ser acuáticos o terrestres; además también se alimentan de algunos pastos y frutas (Gallo-Reynoso, 2008). Las nutrias de río tienen la capacidad para bucear, principalmente con fines de búsqueda de alimento. Los buceos rutinarios tienen una duración aproximada de 30 seg (Bertonatti y Parera, 1994). En Escocia, se han registrado buceos de las nutrias europeas (*Lutra lutra*) con una profundidad máxima de 14 m; sin embargo, la mayoría (98%) de los buceos

ocurren en aguas someras a menos de 8 m de profundidad (Nolet *et al.*, 1993; Kruuk, 1995). Se ha sugerido que los buceos someros de las nutrias de río son menos demandantes desde el punto de vista energético (se puede invertir más tiempo en busca de presas, en lugar de invertirlo en nadar de la superficie hacia el fondo y viceversa, o de la costa a las zonas profundas que generalmente están lejos de tierra) y que durante los buceos someros las nutrias de río pierden menos calor ya que la capa de aire atrapada entre su denso pelaje inferior no se comprime por la presión hidrostática, evitando que su piel entre en contacto con el agua y pierda calor (Nolet *et al.*, 1993; Dunstone, 1998). Por ello, las nutrias de río invierten tiempo y energía en mantener su pelaje inferior, acicalándolo entre cada buceo o después de un ciclo de buceo; el tiempo de acicalado en tierra es directamente proporcional al tiempo y profundidad del buceo (Kruuk, 1995; Dunstone, 1998).

Además de la marcada diferencia en cuanto a profundidad y duración de los buceos entre mamíferos semiacuáticos y mamíferos marinos, otra diferencia entre ambos grupos es la locomoción acuática. Los mamíferos semiacuáticos se consideran nadadores ineficientes; invierten un mayor gasto energético por el arrastre hidrodinámico producido al nadar en la superficie o cerca de ésta (Dunstone, 1998; Williams, 2001). En mamíferos semiacuáticos la propulsión es generada por movimientos dorso-ventrales alternados de las extremidades posteriores, las cuales presentan membranas interdigitales que permiten una mayor propulsión (Fish, 1993). Sin embargo, el poder de propulsión no es tan pronunciado en comparación al de mamíferos marinos (en los cuales la propulsión también se genera por movimientos dorso-ventrales de las extremidades posteriores que en el caso de los cetáceos y pinnípedos están modificadas en aletas), dado que las extremidades posteriores de las nutrias sólo están ligeramente modificadas para el ambiente acuático (Fish, 2000). De acuerdo a lo anterior, no sólo la morfología y fisiología de los mamíferos semiacuáticos, y en particular de la nutria de río, han determinado su éxito como especie intermedia; la ecología de éstas especies y la oportunidad de presas disponibles en ríos y lagos someros han favorecido la conquista de dichos ambientes y su permanencia como especie en transición (Harrington *et al.*, 2012).

1.5 Cerdo doméstico

Las propiedades físicas del ambiente terrestre difieren de aquellas del ambiente acuático y, por lo tanto, los organismos que lo habitan, presentan adaptaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que difieren de las de los organismos acuáticos. Los mamíferos terrestres deben de enfrentarse a la resistencia generada por el aire (arrastre aerodinámico); por ejemplo, para un humano la resistencia aerodinámica al caminar o trotar es mínima; al correr a velocidad promedio, el porcentaje energético necesario para contrarrestar el arrastre aerodinámico es de 7.5% y, debido a que éste incrementa con la velocidad, el costo energético puede aumentar hasta 13%; por ende, el arrastre aerodinámico consume sólo un porcentaje relativamente pequeño del costo energético total (Schmidt-Nielsen, 1997). Las extremidades de los mamíferos terrestres están diseñadas para la locomoción en tierra y para el soporte del peso corporal impuesto por la fuerza de gravedad (Schmidt-Nielsen, 1997; Fish, 2000).

El cerdo doméstico (*Sus scrofa*, Linnaeus 1758) es un mamífero terrestre que pertenece a la familia Suidae y al orden Artiodactyla (Álvarez-Romero y Medellín, 2005). Esta es una especie utilizada en estudios anatómicos y fisiológicos comparativos ya que comparte numerosas características anatómicas (tamaño corporal, sistema cardiovascular, piel, sistema urinario) y fisiológicas (sistema gastrointestinal, sistema inmune) con la especie humana, y se considera un modelo ideal en estudios biomédicos, reemplazando a otras especies como primates no humanos y perros (Swindle y Smith, 1998). El cerdo doméstico se utiliza frecuentemente como modelo para enfermedades como diabetes, aterosclerosis, úlcera gástrica, y procesos como la cicatrización (Mortensen *et al.*, 1998; Swindle y Smith, 1998; Gad, 2007), y se ha empleado como modelo en estudios de hipoxia-isquemia, y sus efectos en el cerebro de neonatos (Leffler *et al.*, 1989; Odden *et al.*, 1989). De igual manera, ha sido el objeto de estudios para desarrollar tratamientos para prevenir o reducir los efectos negativos de la hipoxia-isquemia en cerebro y otros tejidos (O'Brien *et al.*, 2006; Waldenström *et al.*, 2010).

Como especie doméstica abundante, considerada también de granja, el cerdo doméstico es reconocido a nivel mundial como fuente de alimento con alto contenido de proteínas. Los cerdos domésticos crecen y maduran con rapidez, tienen un período de gestación corto

(aproximadamente 114 días) y pueden tener camadas numerosas (Bello-Gutiérrez, 2008). Son omnívoros y consumen una gran variedad de materias alimenticias (Bello-Gutiérrez, 2008). Los adultos de esta especie se caracterizan por presentar un cuerpo pesado (50 a 350 kg) y redondeado, alcanzando una longitud total de 0.9 a 1.8 m; su piel es gruesa pero sensible (como la del humano) (Álvarez-Romero y Medellín, 2005).

Con base en lo anterior, el presente trabajo está enfocado a analizar algunas de las enzimas y compuestos intermediarios del metabolismo de purinas en tres especies de mamíferos adaptadas a diferentes ambientes, acuático (elefante marino del norte), semiacuático (nutria neotropical) y terrestre (cerdo doméstico), para determinar si existen diferencias asociadas a las adaptaciones al buceo.

2. ANTECEDENTES

A la fecha, no se han reportado trabajos en los que se analice de manera general el metabolismo de purinas en mamíferos acuáticos, mucho menos en especies semiacuáticas. Por la importancia de varias de las enzimas del metabolismo de purinas en enfermedades autoinmunes y cáncer, así como en aspectos de xenotransplantes, los mamíferos terrestres, en particular el humano, son las especies más estudiadas al respecto (Bardot *et al.*, 1994; Nyhan, 2005; Smolenski *et al.*, 2005; Yuen *et al.*, 2006; Khalpey *et al.*, 2007). Sin embargo, los componentes purínicos que se han analizado en mamíferos acuáticos son los metabolitos HX y X y las enzimas XO y HGPRT que están involucrados en degradación y reciclado de purinas.

Uno de los primeros trabajos fue el de Elsner *et al.* (1995) en el que midieron la concentración de HX en plasma, riñón y corazón de foca de Groenlandia (*Phoca groenlandica*) y foca anillada (*P. hispida*) sometidos a condiciones de buceos experimentales (en el caso de las muestras de plasma) e isquemia experimental (en riñón y corazón). Observaron que en plasma de ambas especies no se detectó HX antes o después de los buceos, mientras que la concentración de HX en ambos tejidos incrementó significativamente después de 30 minutos de isquemia experimental.

Más tarde, Elsner *et al.* (1998) midieron la producción de HX en riñón y corazón de foca anillada (*P. hispida*) y cerdo doméstico (*S. scrofa*) expuestos a condiciones de isquemia experimental. Observaron una mayor producción de HX en los tejidos de cerdo doméstico en comparación con los de foca anillada, con lo que sugieren que la foca presenta una mayor habilidad de conservar reservas energéticas (ATP), posiblemente a través del reciclado de HX por la enzima HGPRT.

Waldenström *et al.* (2010) analizaron el mecanismo de pre-acondicionamiento isquémico en miocardio de cerdo doméstico. Observaron que durante isquemia, la administración de adenosina (que se convierte a inosina, sustrato de la enzima PNP para generar HX, vía la enzima adenosina deaminasa) puede generar energía, ya que produce adenina e HX (sustratos de las enzimas del reciclado de purinas) sin necesidad de ATP. Por lo tanto, concluyen que el pre-acondicionamiento es un mecanismo ideal para la producción de ATP a nivel micromolar.

Vázquez-Medina *et al.* (2011) midieron la actividad de XO y las concentraciones de HX y X en plasma de crías destetadas de elefante marino del norte antes, durante y después de apnea asociada al sueño y a inmersiones voluntarias. Observaron que en ambos casos, las concentraciones de HX y X eran más altas al final que al inicio de las apneas y que éstas aumentaban durante los períodos de recuperación, regresando de manera gradual a valores normales durante la respiración normal (eupnea). Durante las inmersiones voluntarias los autores observaron que tanto la actividad de XO como las concentraciones de HX y X disminuyeron al inicio y aumentaron al final, regresando a niveles de eupnea durante el período de recuperación. La conclusión de este estudio es que las diferencias de concentración de HX y X y de la actividad de XO observadas en ambos tipos de apnea están asociadas con el grado de la respuesta al buceo durante la apnea con y sin inmersión. Diversos estudios han encontrado que las apneas que involucran inmersión de la cara del animal conllevan una respuesta al buceo (bradicardia, hipometabolismo, contracción del bazo) más aguda en comparación con apneas en tierra (Elsner, 1999; Thornton *et al.*, 2001).

Soñanez-Organis *et al.* (2012) midieron la concentración de HX y X y la actividad de XO y HGPRT en plasma de crías de elefante marino del norte en diferentes etapas (1, 3, 5 y 7 semanas) del ayuno post-destete. Los autores observaron que las concentraciones de HX y X disminuyeron después de 3 semanas pero incrementaron notablemente después de las 5 y 7 semanas, mientras que las actividades de XO y HGPRT incrementaron cada semana a lo largo del período de ayuno. En este estudio se concluyó que el ayuno y la apnea del sueño estimulan la degradación de ATP, incrementando el contenido intracelular y circulante de los productos de oxidación, y que el incremento en la actividad de HGPRT sugiere que el reciclado de purinas contribuye a la regeneración de ATP permitiendo a las crías de elefante marino del norte satisfacer la demanda energética a lo largo del período de ayuno post-destete.

3. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo de las purinas se lleva a cabo a través de un conjunto de rutas bioquímicas encargadas de la síntesis, degradación y reciclado de intermediarios y nucleótidos esenciales para el funcionamiento y desarrollo celular (Cosgrove, 1998; Pang *et al.*, 2012). Por lo anterior, la concentración de los metabolitos y nucleótidos purínicos, como el ATP, y la actividad de las enzimas que intervienen en su síntesis, reciclado y degradación, pueden utilizarse como indicador del estado metabólico de los tejidos. Dado que la síntesis *de novo* de ATP requiere de oxígeno, y la mayoría de las especies de mamíferos no están adaptadas a tolerar condiciones de hipoxia e isquemia que resultan en degradación de ATP (Elsner *et al.*, 1998), es interesante explorar si existen diferencias en la actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo de purinas y en la concentración de metabolitos y nucleótidos purínicos entre especies de mamíferos con diferentes capacidades de buceo, como el elefante marino del norte, la nutria neotropical y el cerdo doméstico.

4. HIPÓTESIS

Si el elefante marino del norte presenta mecanismos fisiológicos para contrarrestar los efectos negativos de la hipoxia e isquemia asociados a apneas del buceo y del sueño, entonces presentará un sistema de reciclado de purinas que maximiza la regeneración de ATP en comparación con mamíferos semiacuáticos y terrestres no adaptados a períodos prolongados de hipoxia e isquemia.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Caracterizar los principales componentes del metabolismo de las purinas en tres especies de mamíferos, acuático (elefante marino del norte), semiacuático (nutria neotropical) y terrestre (cerdo doméstico).

5.2. Particulares

- 5.2.1. Cuantificar la actividad de las enzimas (PNP, XO, HGPRT, IMPDH) que intervienen en las vías de reciclado, degradación y síntesis *de novo* de purinas en músculo, plasma y eritrocitos de elefante marino del norte, nutria neotropical y cerdo doméstico.
- 5.2.2. Cuantificar la concentración de los metabolitos y nucleótidos producidos en las vías de reciclado, degradación y síntesis *de novo* de purinas (HX, X, ácido úrico, inosina, adenosina, IMP, ATP, ADP, AMP, GDP, GTP y NAD⁺) en músculo, plasma y eritrocitos de elefante marino del norte, nutria neotropical y cerdo doméstico.
- 5.2.3. Comparar las actividades enzimáticas y concentración de los nucleótidos y metabolitos entre los diferentes tejidos para cada especie.
- 5.2.4. Comparar las actividades enzimáticas y concentración de los nucleótidos y metabolitos por tejido entre especies.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta de muestras de sangre y músculo

Las muestras de elefante marino del norte (*M. angustirostris*) se colectaron en el parque estatal Año Nuevo, California, Estados Unidos, en colaboración con el personal de University of California, Merced y Sonoma State University. Se capturaron 11 individuos pertenecientes a la colonia residente del parque estatal Año Nuevo y se registró el sexo, peso (kg) y edad aproximada de cada individuo. Previo a la toma de muestra, los elefantes marinos fueron sedados con telazol (tiletamina/zolazepam HCl, 1 mg kg⁻¹, Fort Dodge Labs, Ft Dodge, IA, USA) administrado por vía intramuscular, como se ha descrito anteriormente (Ortiz *et al.*, 2003). De cada individuo se colectó una muestra de sangre de la vena extradural. Para obtener las biopsias de músculo esquelético, a cada individuo se le aplicó una inyección subcutánea de un volumen apropiado de lidocaína como anestésico local y se introdujo una aguja estéril *dermapunch* en el flanco cerca de una de las aletas traseras (Ortiz *et al.*, 2003). Las biopsias se enjuagaron con solución salina fisiológica (0.9%) en frío y se almacenaron en crioviales que se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su traslado a laboratorio donde se congelaron a -80°C.

Las muestras de nutria neotropical (*L. longicaudis annectens*) se obtuvieron de cuatro organismos en cautiverio y fueron colectadas por el personal médico veterinario del Acuario de Veracruz como parte de los procedimientos rutinarios para verificar su estado de salud. Para ello, los individuos fueron anestesiados con una mezcla de xilacina (1.5 mg kg⁻¹) y ketamina (1.5 mg kg⁻¹). Se extrajo la sangre de la vena cefálica de la extremidad anterior derecha utilizando una aguja alada calibre 21 G x 3/4" x 7" (0.8 x 19 mm x 178 mm, BD Vacutainer®) y se registró el peso, longitud y edad de cada individuo.

Las muestras de 11 cerdos domésticos (*S. scrofa*) se colectaron *post-mortem* en el rastro municipal de La Paz, Baja California Sur, en un período no mayor a 30 min posterior al sacrificio. De cada individuo se obtuvo una muestra de sangre de la vena yugular y una muestra de músculo esquelético del cuádriceps. Se colectaron aproximadamente 30 g de músculo, se enjuagaron con solución fisiológica salina (0.9%) fría, se almacenaron en

crioviales y se congelaron a -80°C . Previo a la obtención de las muestras, se registró la edad y peso aproximado de cada individuo.

El procedimiento para la colecta de muestras de sangre y su procesamiento para la separación de suero, plasma y eritrocitos fue la misma para las tres especies. Las muestras de sangre (5-10 mL) se colectaron en tubos Vacutainer[®] sin anticoagulante para la recuperación de suero, y con EDTA (como anticoagulante) para recuperar plasma y eritrocitos. Las muestras de sangre de los tubos Vacutainer[®] sin anticoagulante se centrifugaron a $1000 \times g$ por 10 min en una centrífuga de campo (Mobilespin 126, Vulcon Technologies, Grandview, MO, USA); el suero recuperado se colocó en tubos eppendorf debidamente etiquetados y se congelaron a -80°C . De las muestras de sangre con EDTA se obtuvo el nivel de hematocrito (Hct) para cada muestra, antes de separar el plasma y los eritrocitos, utilizando capilares y una centrífuga para hematocrito (ZipOCRIT LW Scientific, Inc. Modelo ZO-1, Tucker, Georgia, USA). Posteriormente, los tubos Vacutainer[®] con EDTA se centrifugaron y se recuperó el plasma, el cual fue almacenado en tubos eppendorf a -80°C . Se eliminó la capa de leucocitos y al paquete de eritrocitos se le practicó una serie de lavados con solución salina fisiológica (0.9%) para eliminar restos extracelulares y obtener sólo los paquetes de eritrocitos que se alicuotaron en tubos eppendorf y se almacenaron en ultracongelador a -80°C hasta su análisis.

6.2. Preparación de las muestras

6.2.1. Extractos de músculo esquelético

Se homogenizaron las muestras de músculo (aproximadamente 50 mg) en solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.5) y 1% de inhibidor de proteasas (PMSF en etanol) a 12000 rpm, manteniendo el material sobre un baño de hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a $2124 \times g$ durante 15 min a 4°C , recuperando el sobrenadante para su posterior análisis.

6.2.2. Contenido intraeritrocitario

Previo al análisis de muestras, el material intraeritrocitario fue tratado con un choque osmótico agregando agua destilada fría y sometiénolo a dos ciclos de

congelación/descongelación adicional. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1000 x g por 15 min en una centrífuga refrigerada y se recuperó el sobrenadante para su análisis.

6.3. Actividad enzimática

6.3.1. Purina nucleósido fosforilasa (PNP, E.C. 2.4.2.1)

La actividad de PNP se monitoreó por espectrofotometría siguiendo el protocolo descrito por Chu *et al.* (1989). Dicho método utiliza al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se forma en las reacciones catalizadas por las enzimas PNP y XO para oxidar los compuestos ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico (DHBS, $C_6H_3Cl_2NaO_4S$) y 4-aminoantipirina ($C_{11}H_{13}N_3O$) por medio de la enzima peroxidasa. Esta reacción cataliza la formación del producto N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinonamonoimina de coloración rojiza, el cual es monitoreado a 520 nm y 25°C. Las muestras se analizaron por triplicado en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 800, Fullerton, CA, USA). Se registró el cambio de absorbancia cada 10 seg durante dos min. Una unidad de PNP se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μM de inosina por minuto a 25°C, registrándose cambios en la absorbancia de 0.022. Los resultados se expresan como U de PNP mg^{-1} de proteína. El límite de detección de la actividad de PNP con esta técnica es de 0.05 U mg^{-1} de proteína.

6.3.2. Xantina oxidasa (XO, E.C. 1.17.3.2)

La actividad de XO se monitoreó por espectrofotometría utilizando el kit de ensayo Amplex®Red (Molecular Probes, Eugene, OR, USA.) y un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finlandia). La XO cataliza la oxidación de bases purínicas HX a xantina a ácido úrico, produciendo también radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). En este ensayo, el $O_2^{\bullet-}$ se degrada espontáneamente a H_2O_2 y éste, en presencia de peroxidasa de rábano, reacciona estequiométricamente con el reactivo Amplex®Red, generando un producto de oxidación rojo fluorescente llamado resorufina, el cual absorbe a 570 nm. Se registró el cambio de absorbancia cada cinco min durante 40 min a 570 nm y 37°C. Una unidad de XO se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μM de ácido úrico por

minuto a 25°C. Los resultados se expresan como mU de XO mg^{-1} de proteína. El límite de detección de la actividad de XO con este kit es 0.0012 mU mg^{-1} de proteína.

6.3.3. Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT, E.C. 2.4.2.8)

La actividad de HGPRT se monitoreó por espectrofotometría utilizando el kit de ensayo PRECICE HPRT® Assay Kit (NOVOCIB, Lyon, Francia) y un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finlandia). La enzima HGPRT cataliza la conversión reversible de bases (HX ó guanina) a nucleósidos monofosfato (inosina monofosfato (IMP) ó guanosina monofosfato, respectivamente), utilizando fosforribosilpirofosfato (PRPP). En este ensayo, la actividad enzimática se mide como la tasa de producción de IMP, que es oxidado por la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), al mismo tiempo que se reduce NAD^+ a NADH. Se registró el cambio de absorbancia cada cinco min durante 120 min, a 340 nm y 37°C. Los resultados se expresan como nmol mg^{-1} de proteína hora⁻¹. El límite de detección de la actividad de HGPRT con este kit es 0.004 nmol mg^{-1} de proteína h⁻¹.

6.3.4. Inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH, E.C. 1.1.1.205)

La actividad de IMPDH se determinó de manera indirecta cuantificando la concentración de xantosina monofosfato (XMP), que es producto de la reacción que cataliza esta enzima durante la conversión de IMP a XMP. La cuantificación de XMP se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución por intercambio iónico (ó HPLC por sus siglas en inglés, *high performance liquid chromatography*) (Glander *et al.*, 2001). Para cuantificar la concentración de XMP, se realizó una curva estándar a diferentes concentraciones. Se lisaron los eritrocitos diluyendo la muestra en una solución fría de agua destilada y dithiothreitol (DTT 4 mM) y se incubó por tres h a 37°C, utilizando una mezcla de amortiguador de fosfato de sodio (40 mM), IMP (0.5 mmol L⁻¹), NAD^+ (0.25 mmol L⁻¹) y KCl (50 mmol L⁻¹), a pH 7.4. Para detener la reacción, se agregó ácido perclórico frío a 4M, y se neutralizó con carbonato de potasio (KCO_3 5 M) incubando a -80°C durante 30 min. Una vez que se obtuvo el extracto de interés, se filtró a través de una membrana Millex GV de 0.22 μm (Millipore Int., Bedford, MA, USA), se colocó en un vial para HPLC y se

analizó por duplicado. Se utilizó una columna Prontosil 120 a 5 ODS AQ (250 mm x 3.1 mm) para la fase estacionaria; la fase móvil estuvo compuesta por KH_2PO_4 (50 mM), TBA (7 mM) y metanol (94% v/v) pH 5.5 a temperatura ambiente. La detección de XMP en las muestras se realizó con base en la longitud de onda y tiempo de retención del pico de interés. La concentración se calculó a partir de la ecuación de la recta ajustada a la curva estándar y el área del pico correspondiente en el cromatograma. Una unidad de IMPDH se define como la cantidad de enzima que se necesita para producir 1 μM de XMP. Los resultados se expresan como nmol mg^{-1} de proteína hora^{-1} . El límite de detección de la actividad de IMPDH con esta técnica es 4.28 U mg^{-1} de proteína h^{-1} .

6.4. Concentración de nucleótidos y metabolitos purínicos

La concentración de los nucleótidos y metabolitos de las purinas (HX, X, ácido úrico, IMP, inosina, adenosina, NAD^+ , AMP, ADP, ATP, GMP y GTP) en eritrocitos, plasma y músculo se determinó mediante HPLC (Gianattasio *et al.*, 2003). Para cuantificar la concentración de cada nucleótido y metabolito, se analizó una curva con la mezcla de estándares a concentraciones conocidas. Las muestras se trataron con ácido perclórico (HClO_4 0.5 M) frío para extraer los nucleótidos y metabolitos de interés; posteriormente, se neutralizó con hidróxido de potasio (KOH 0.5 M) y fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 , 1 M pH 7.5). Una vez que se obtuvo el extracto de interés, se filtró a través de una membrana Millex GV de 0.22 μm (Millipore Int., Bedford, MA, USA), se colocó en un vial para HPLC y se analizó por duplicado. Se utilizó una columna ODS Hypersil 125 x 4.6 mm, con tamaño de partícula 3 μm . La fase móvil estaba compuesta por dos soluciones amortiguadoras (0.1 M KH_2PO_4 , 8 mM TBA, pH 6.0 a temperatura ambiente y 0.1 M KH_2PO_4 , 8 mM TBAs, 30% v/v CH_3CN , pH 6.0). La identificación de los nucleótidos y metabolitos en las muestras se realizó con base en la longitud de onda y tiempo de retención de cada uno. La concentración se calculó a partir de la ecuación de la recta ajustada a la curva estándar y el área de los picos correspondientes de cada nucleótido y metabolito en el cromatograma. Los resultados se expresan como $\mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína. El límite de detección de la concentración de los nucleótidos y metabolitos de las purinas mediante esta técnica cromatográfica es de $0.0025 \mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína.

6.5. Determinación de proteínas totales

Para estandarizar los datos de las actividades enzimáticas y la concentración de nucleótidos y metabolitos de las purinas, se determinó la concentración de proteínas solubles en las muestras analizadas. Lo anterior se llevó a cabo por el método de Bradford (1979), cuyo principio básico es la tinción de las proteínas con el colorante Coomassie® (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). Brevemente, con base en una curva de calibración de albúmina bovina a concentraciones de 0.2 a 0.005 mg mL⁻¹, se determinó la concentración de las proteínas presentes en los lisados y pellets resultantes de la preparación de muestras para las diferentes técnicas enzimáticas y cromatográficas. A cada pozo de una microplaca, se le agregó colorante Coomassie® y la curva estándar o la muestra; en cada placa se incluyó un blanco con agua destilada y colorante Coomassie®. Se incubó durante 15 min y se leyó la absorbancia a 620 nm en un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finlandia). La cantidad de proteínas solubles se calculó a partir de la ecuación de la recta ajustada a la curva estándar y se expresó en mg de proteína mL⁻¹ de plasma o contenido intraeritrocitario o en mg de proteína mL⁻¹ de homogenizado de músculo.

6.6. Análisis estadísticos

A los datos obtenidos se les aplicó una prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnoff) y una prueba de homocedasticidad (Levene). Para determinar las diferencias entre los tejidos de cada especie y por tejido entre especies, se realizaron análisis de variancia por rangos de Kruskal-Wallis o U de Mann-Whitney, según fuera apropiado (Zar, 1999). En los casos en que las actividades enzimáticas o las concentraciones de nucleótidos y metabolitos de las purinas estuvieran por debajo del límite de detección (LD), para realizar los análisis estadísticos, se utilizaron valores equivalentes a la mitad del límite de detección (LD/2; Farnham *et al.*, 2002). Se consideró $\alpha < 0.05$ como nivel de significancia estadística. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete SYSTAT® ver. 12.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) para computadora personal.

7. RESULTADOS

7.1. Muestras de sangre y músculo

Se obtuvieron muestras de eritrocitos, plasma y suero de 11 elefantes marinos del norte, cuatro nutrias neotropicales y 11 cerdos domésticos. Sólo se obtuvieron muestras de músculo de cerdo doméstico (n= 11) y elefante marino del norte (n= 11), ya que los individuos de nutria neotropical muestreados en este estudio son parte de la colección del Acuario de Veracruz y, por las restricciones de la normatividad vigente, no fue posible obtener biopsias de músculo esquelético.

7.2. Características de historia de vida de cada especie

Los individuos de cerdo doméstico y nutria neotropical muestreados eran adultos de 1.5 y 3.3 años de edad, respectivamente, que viven en cautiverio, mientras que los individuos de elefante marino del norte, eran juveniles de vida silvestre de ocho meses de edad. La edad, peso, estilo de vida y dieta de cada una de las especies analizadas se presentan en la Tabla II.

Tabla II. Edad, peso, estilo de vida y dieta de las tres especies analizadas (cerdo doméstico, n= 11; nutria de río, n= 4; elefante marino del norte, n= 11).

Especie	Edad (años)	Peso (kg)	Estilo de vida	Dieta
Cerdo doméstico	1.5 ± 0.7 (adultos)	NA	Cautiverio (granja)	Omnívora
Nutria neotropical	3.3 ± 1.4 (adultos)	6.84 ± 0.4	Cautiverio (acuario)	Pescado
Elefante marino del norte	~0.8 (anuales)	126.36 ± 4.08	Vida silvestre	Calamares y peces

Los datos de edad y peso se presentan como promedio ± error estándar.

7.3. Hematocrito

Los valores de hematocrito de elefante marino del norte y nutria neotropical (54.63 ± 1.58% y 50.25 ± 0.62%, respectivamente), fueron significativamente mayores que el de

cerdo doméstico ($35.63 \pm 2.67\%$, $p= 0.000$ y $p= 0.003$, respectivamente). Los resultados del hematocrito se muestran en la figura 2 y se presentan como media \pm error estándar.

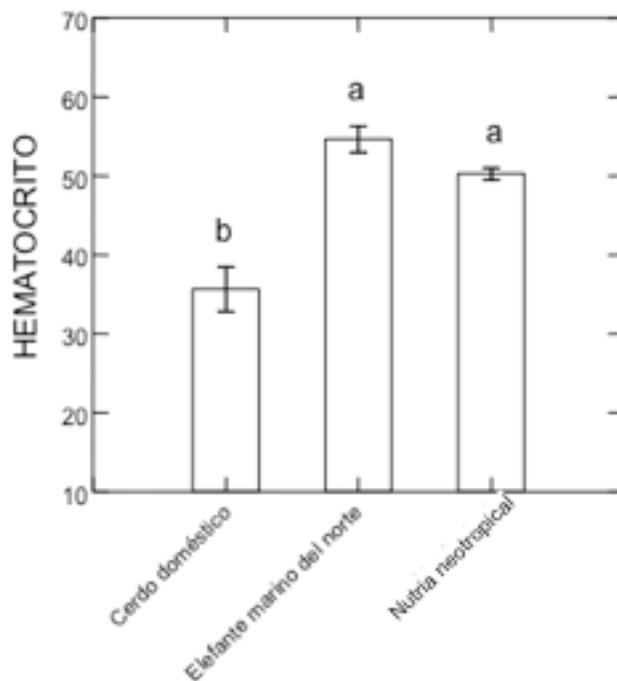


Figura 2. Hematocrito (%) de las tres especies analizadas (cerdo doméstico, $n= 11$; elefante marino del norte, $n= 11$; nutria de río, $n= 4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar, letras diferentes denotan diferencias significativas ($p<0.05$).

7.4. Actividad enzimática

7.4.1. Purina nucleósido fosforilasa (PNP, E.C. 2.4.2.1)

La actividad de PNP en eritrocitos y músculo de cerdo doméstico fue 29.12 (25.32, 35.04) $U\ mg^{-1}$ de proteína y 6.07 (4.84, 10.44) $U\ mg^{-1}$ de proteína, respectivamente, y en eritrocitos y músculo de elefante marino del norte fue 3.41 (2.61, 3.59) $U\ mg^{-1}$ de proteína y 4.68 (4.31, 9.80) $U\ mg^{-1}$ de proteína, respectivamente. En eritrocitos de nutria neotropical la actividad de PNP estuvo por debajo del límite de detección. En plasma, la actividad de PNP en muestras de nutria neotropical fue de 0.105 (0.089, 0.118) $U\ mg^{-1}$ de proteína, mientras que en muestras de elefante marino del norte y cerdo doméstico estuvo por debajo del límite de detección. La actividad de la enzima PNP en los tejidos de las tres especies

incluidas en este estudio se resume en la Tabla III y en la figura 3, y se presenta como mediana y percentiles (25% y 75%).

Tabla III. Actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de purinas en tejidos de cerdo doméstico (n= 11), nutria neotropical (n= 4) y elefante marino del norte (n= 11).

Especie	Tejido	PNP (U mg ⁻¹ proteína)	XO (mU mg ⁻¹ proteína)	HGPRT (nmol mg ⁻¹ proteína h ⁻¹)	IMPDH (nmol mg ⁻¹ proteína h ⁻¹)
Cerdo doméstico	Eritrocitos	29.12 ^{a*} (25.32, 35.04)	ND	1.31 ^{a*} (1.12, 1.35)	37.24 ^a (31.85, 47.53)
	Plasma	ND	0.003 ^{b*} (0.002, 0.003)	0.026 [†] (0.019, 0.036)	ND
	Músculo	6.07 [†] (4.84, 10.44)	0.052 [†] (0.037, 0.066)	ND	NA
Nutria neotropical	Eritrocitos	ND	ND	0.039 ^{b*} (0.033, 0.046)	36.92 ^a (22.39, 40.17)
	Plasma	0.105 (0.089, 0.118)	0.003 ^b (0.003, 0.004)	0.013 [†] (0.009, 0.019)	ND
Elefante marino del norte	Eritrocitos	3.41 ^{b*} (2.61, 3.59)	ND	0.035 ^{b*} (0.029, 0.050)	14.06 ^b (9.09, 15.86)
	Plasma	ND	0.017 ^{a*} (0.015, 0.020)	0.015 [†] (0.003, 0.022)	ND
	Músculo	4.68 [†] (4.31, 9.80)	0.060 [†] (0.057, 0.097)	ND	NA

Los resultados se presentan como mediana y percentiles (25%,75%). PNP= purina nucleósido fosforilasa, XO= xantina oxidasa, HGPRT= hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, IMPDH= inosina monofosfato deshidrogenasa. ND= por debajo del límite de detección. NA= No analizado. Letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies; símbolos diferentes (*, †) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie.

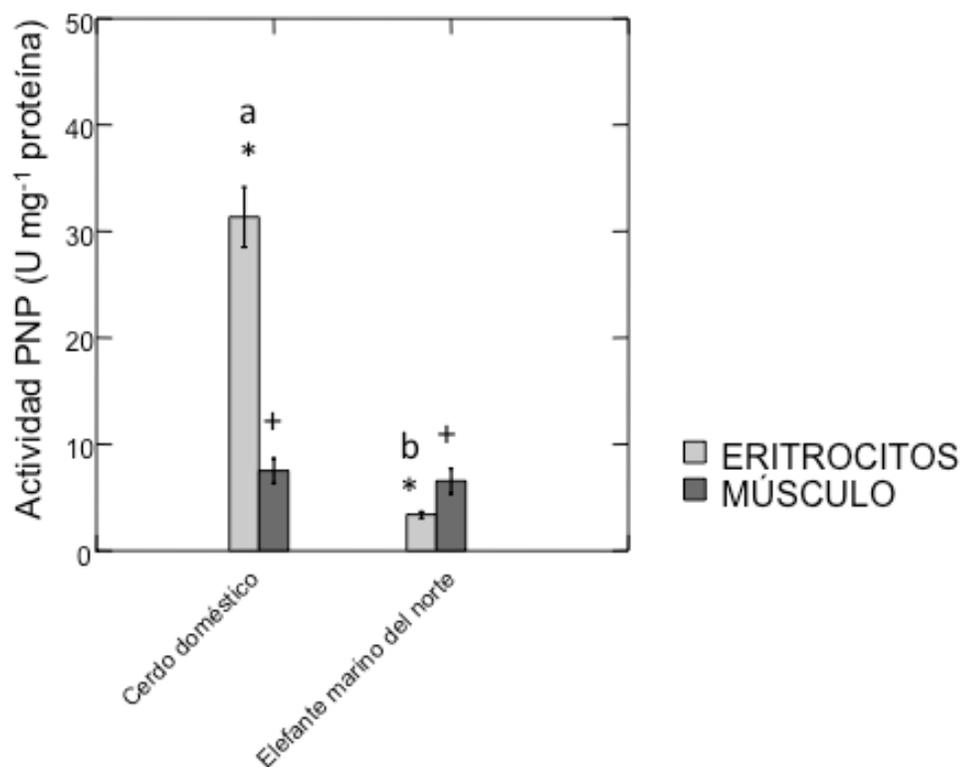


Figura 3. Actividad de la enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP, U mg⁻¹ proteína) en eritrocitos y músculo de cerdo doméstico (n= 11) y elefante marino del norte (n= 11). Los datos se presentan como media ± error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas (p<0.05) entre especies; los símbolos (*, +) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie (p<0.05).

7.4.1.1. Comparación por especie entre tejidos

La actividad de PNP en eritrocitos de cerdo doméstico fue significativamente mayor que en músculo (p<0.001) (Tabla III, Fig. 3). En elefante marino del norte, la actividad de PNP fue significativamente mayor en músculo que en eritrocitos (p= 0.020) (Tabla III, Fig. 3). En la nutria neotropical, debido a que la actividad de PNP en eritrocitos estuvo por debajo del límite de detección, no se pudo realizar la comparación entre tejidos.

7.4.1.2. Comparación por tejido entre especies

En eritrocitos, la actividad de PNP fue significativamente mayor en las muestras de cerdo doméstico que en las de elefante marino del norte (p= 0.001) (Tabla III, Fig. 3). En músculo, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de PNP entre las

muestras de cerdo doméstico y las de elefante marino del norte ($p= 0.309$) (Tabla III, Fig. 3). En plasma de cerdo doméstico y elefante marino del norte, la actividad de PNP estuvo por debajo del límite de detección (Tabla III); por lo tanto, no se pudo realizar comparación entre especies.

7.4.2. Xantina oxidasa (XO, E.C. 1.17.3.2)

La actividad de XO en plasma de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte fue de 0.0032 (0.0024, 0.0034) mU mg⁻¹ de proteína, 0.0033 (0.0032, 0.0034) mU mg⁻¹ de proteína y 0.017 (0.015, 0.020) mU mg⁻¹ de proteína, respectivamente. La actividad de XO en eritrocitos de las tres especies estudiadas estuvo por debajo del límite de detección. Los resultados de la actividad de XO en tejidos de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte se resumen en la Tabla III y en la figura 4, y se presentan como mediana y percentiles (25% y 75%).

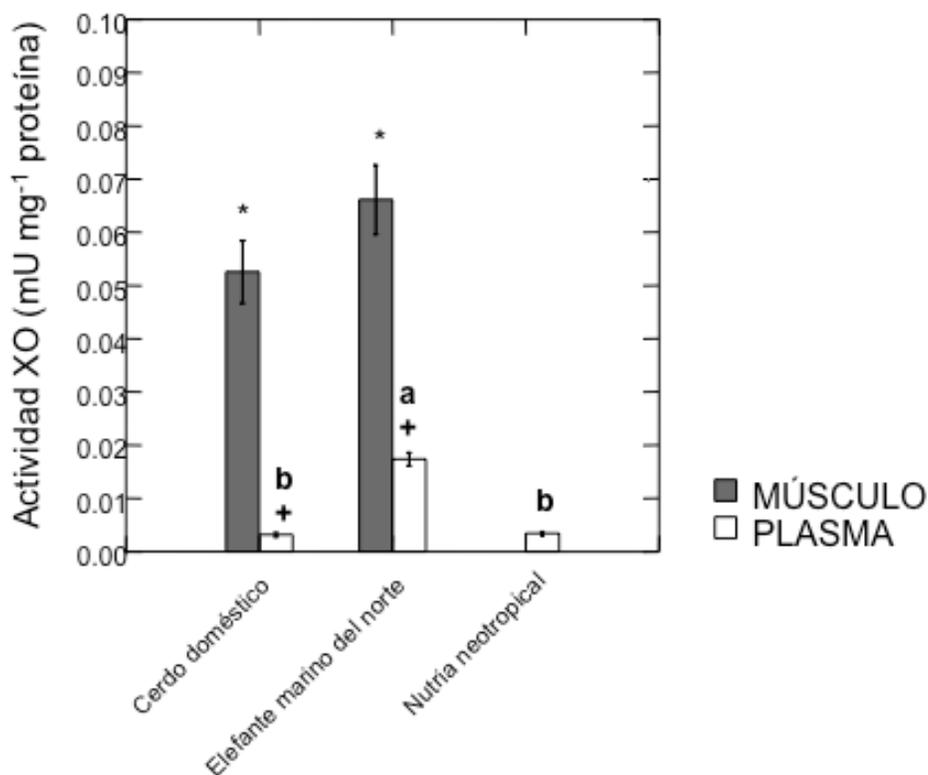


Figura 4. Actividad de la enzima xantina oxidasa (XO, mU mg⁻¹ proteína) en músculo y plasma de cerdo doméstico (n= 11), elefante marino del norte (n= 11) y nutria neotropical (n= 4). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies ($p < 0.05$); los símbolos (*, +) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p < 0.05$).

7.4.2.1. Comparación por especie entre tejidos

La actividad de XO fue significativamente mayor en músculo que en plasma de cerdo doméstico ($p < 0.001$) (Tabla III, Fig. 4). De manera similar, en el elefante marino del norte la actividad de XO fue significativamente mayor en músculo que en plasma ($p < 0.001$) (Tabla III, Fig. 4). En nutria neotropical, la actividad de XO estuvo por arriba del límite de detección sólo en plasma (Tabla III, Fig. 4), por lo que no se pudo realizar comparación entre tejidos.

7.4.2.2. Comparación por tejido entre especies

La actividad de XO fue significativamente mayor en plasma de elefante marino del norte que de cerdo doméstico y de nutria neotropical ($p < 0.001$) (Tabla III, Fig. 4). No se

encontraron diferencias significativas en la actividad de XO en plasma entre la nutria neotropical y el cerdo doméstico ($p= 0.984$) (Tabla III, Fig. 4). No se encontraron diferencias significativas en la actividad de XO en músculo de cerdo doméstico en comparación con el músculo de elefante marino del norte ($p= 0.053$) (Tabla III, Fig. 4). En eritrocitos, la actividad de XO estuvo por debajo del límite de detección (Tabla III).

7.4.3. Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT, E.C. 2.4.2.8)

La actividad de HGPRT en músculo de cerdo doméstico y de elefante marino del norte estuvo por debajo del límite de detección. La actividad de HGPRT en eritrocitos y plasma de cerdo doméstico fue $1.31 (1.12, 1.35) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$ y $0.026 (0.019, 0.036) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, respectivamente; en eritrocitos y plasma de nutria neotropical fue $0.039 (0.033, 0.046) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$ y $0.013 (0.009, 0.019) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, respectivamente, y en eritrocitos y plasma de elefante marino del norte fue de $0.035 (0.029, 0.050) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$ y $0.015 (0.003, 0.022) \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, respectivamente. Los resultados de la actividad de HGPRT en tejidos de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte se resumen en la Tabla III y figura 5, y se presentan como mediana y percentiles (25% y 75%).

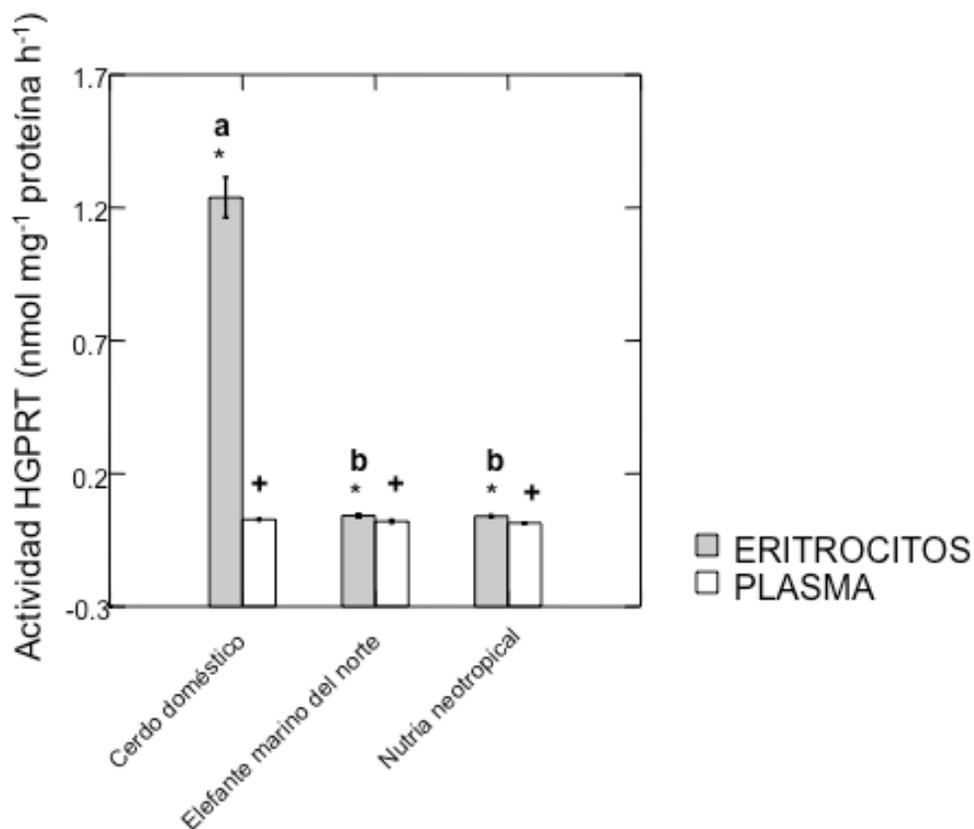


Figura 5. Actividad de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT, $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$) en plasma y eritrocitos de cerdo doméstico ($n= 11$), elefante marino del norte ($n= 11$) y nutria neotropical ($n= 4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies ($p<0.05$); los símbolos (*, +) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p<0.05$).

7.4.3.1. Comparación por especie entre tejidos

La actividad de HGPRT fue significativamente mayor en eritrocitos que en plasma de cerdo doméstico ($p<0.001$), elefante marino del norte ($p= 0.017$) y nutria neotropical ($p= 0.021$) (Tabla III, Fig. 5).

7.4.3.2. Comparación por tejido entre especies

La actividad de HGPRT fue significativamente mayor en eritrocitos de cerdo doméstico que en eritrocitos de elefante marino del norte ($p<0.001$) y nutria neotropical ($p<0.001$) (Tabla III, Fig. 5). No se encontraron diferencias significativas en la actividad de HGPRT

de eritrocitos de elefante marino del norte en comparación con los de nutria neotropical ($p=1.000$) (Tabla III, Fig. 5). No se observaron diferencias significativas en muestras de plasma entre especies ($p=0.090$) (Tabla III, Fig. 5).

7.4.4. Inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH, E.C. 1.1.1.205)

La actividad de IMPDH en eritrocitos de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte fue de 37.24 (31.85, 47.53) $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, 36.92 (22.39, 40.17) $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$ y 14.06 (9.09, 15.86) $\text{nmol mg}^{-1} \text{ proteína h}^{-1}$, respectivamente. La actividad de IMPDH en plasma de las tres especies estudiadas estuvo por debajo del límite de detección (Tabla III). Los resultados de la actividad de la enzima IMPDH en tejidos de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte se muestran en la tabla III y figura 6, y se presentan como mediana y percentiles (25% y 75%).

7.4.4.1. Comparación entre especies

La actividad de IMPDH en eritrocitos de cerdo doméstico y de nutria neotropical fue significativamente mayor que en eritrocitos de elefante marino del norte ($p=0.011$) (Tabla III, Fig. 6). No se observaron diferencias significativas en la actividad de IMPDH entre eritrocitos de cerdo doméstico y los de nutria neotropical ($p=0.514$) (Tabla III, Fig. 6). La actividad de IMPDH en plasma de cerdo doméstico y elefante marino del norte estuvo por debajo del límite de detección (Tabla III). No se analizó la actividad de IMPDH en el músculo de cerdo doméstico y elefante marino del norte.

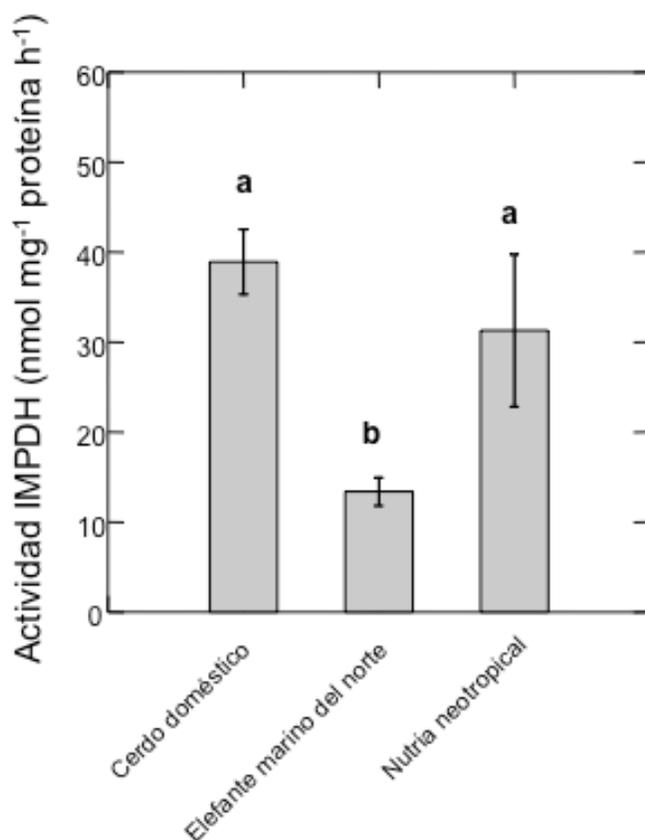


Figura 6. Actividad de la enzima inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH, nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹) en eritrocitos de cerdo doméstico (n= 11), elefante marino del norte (n= 11) y nutria neotropical (n= 4). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies ($p < 0.05$).

7.5 Concentración de nucleótidos y metabolitos purínicos

Se analizaron todas las muestras de cerdo doméstico y nutria neotropical disponibles de cada tejido; de músculo de elefante marino del norte sólo se analizaron cuatro muestras debido a que sólo de estas muestras se contaba con la cantidad suficiente de músculo necesaria para el análisis. La concentración de los nucleótidos y metabolitos detectados en los tres tejidos analizados de cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte se resumen en la Tabla IV y en las figuras 7 a 17, y se presentan como mediana y percentiles (25% y 75%).

7.5.1 Comparación por especie entre tejidos

En el cerdo doméstico, el tejido en el que se detectó mayor número de compuestos purínicos fue en los eritrocitos (se detectaron HX, IMP, NAD⁺, AMP, ADP, ATP, GDP y GTP), seguido de músculo (HX, IMP, NAD⁺, AMP, ADP, ATP, GTP e inosina) y plasma (HX, AMP, ADP, ATP, GDP e inosina). La concentración de HX fue significativamente mayor en músculo que en plasma ($p < 0.001$) y eritrocitos ($p < 0.001$) (Tabla IV, Fig. 7). De manera similar, la concentración de HX fue significativamente mayor en plasma que en eritrocitos ($p = 0.002$). La concentración de NAD⁺ fue significativamente mayor en músculo que en eritrocitos ($p < 0.001$) (Tabla IV, Fig. 8). La concentración de IMP fue significativamente mayor en músculo que en eritrocitos ($p < 0.001$) (Tabla IV, Fig. 9). La concentración de AMP fue significativamente mayor en eritrocitos que en músculo ($p < 0.001$) y plasma ($p < 0.001$) (Tabla IV, Fig. 10). De igual manera, la concentración de AMP fue significativamente mayor en músculo que en plasma ($p < 0.001$) (Tabla IV, Fig. 10). La concentración de ADP fue significativamente mayor en músculo que en eritrocitos ($p < 0.001$) y plasma ($p < 0.001$) (Tabla IV, Fig. 11). De manera similar, la concentración de ADP fue significativamente mayor en eritrocitos que en plasma ($p = 0.037$) (Tabla IV, Fig. 11). La concentración de ATP fue significativamente mayor en eritrocitos que en músculo ($p = 0.042$) (Tabla IV, Fig. 12). La concentración de GDP fue significativamente mayor en eritrocitos que en plasma ($p = 0.005$) (Tabla IV, Fig. 13). La concentración de GTP fue significativamente mayor en músculo que en eritrocitos ($p = 0.003$) (Tabla IV, Fig. 14). No se encontró una diferencia significativa en la concentración de inosina entre plasma y músculo ($p = 0.870$) (Tabla IV, Fig. 15).

Entre las muestras de nutria neotropical, el tejido con mayor número de compuestos purínicos identificados fueron los eritrocitos (HX, IMP, NAD⁺, AMP, ADP, ATP, GDP y GTP; Tabla IV, Figs. 7-14), seguido de plasma (GTP, adenosina, Tabla IV, Fig. 16; ácido úrico, Tabla IV, Fig. 17). El único metabolito que se encontró en ambos tejidos fue GTP. La concentración de GTP fue significativamente mayor en eritrocitos que en plasma ($p = 0.021$) (Tabla IV, Fig. 13).

Tabla IV. Concentración ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) de hipoxantina (HX), inosina 5'-monofosfato (IMP), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), adenosina 5'-monofosfato (AMP), adenosina 5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-trifosfato (ATP), guanosina 5'-difosfato (GDP), guanosina 5'-trifosfato (GTP), inosina, adenosina y ácido úrico en tejidos de cerdo doméstico (n= 11), nutria neotropical (n= 4) y elefante marino del norte (n= 11).

Especie	Tejido	HX	NAD^+	IMP	AMP	ADP	ATP	GDP	GTP	Inosina	Adenosina	Ácido Úrico
Cerdo doméstico	Eritrocitos	0.362 ^{a*} (0.282, 0.429)	0.023 ^{a*} (0.013, 0.035)	1.034 ^{a*} (0.925, 1.567)	2.088 ^{a*} (1.957, 2.736)	1.344 ^{a*} (0.806, 1.615)	0.818 [*] (0.296, 1.059)	0.025 ^{a*} (0.023, 0.215)	0.175 ^{a*} (0.130, 0.220)	ND	ND	ND
	Plasma	1.463 ^o (0.715, 2.047)	ND	ND	0.002 ^o (0.002, 0.016)	0.010 ^o (0.002, 0.016)	ND	0.002 ^o (0.002, 0.021)	ND	0.053 ^a (0.002, 0.076)	ND	ND
	Músculo	6.163 [†] (3.793, 12.113)	4.075 [†] (3.091, 7.697)	70.394 [†] (55.607, 85.014)	0.327 ^{c†} (0.225, 0.354)	6.458 ^{c†} (5.174, 7.641)	0.178 ^{a†} (0.105, 0.290)	ND	0.550 ^{c†} (0.332, 0.844)	0.016 (0.015, 0.022)	ND	ND
Nutria neotropical	Eritrocitos	0.113 ^b (0.081, 0.136)	0.025 ^a (0.015, 0.036)	0.100 ^b (0.056, 0.112)	0.258 ^b (0.167, 0.301)	0.406 ^b (0.276, 0.534)	0.682 (0.537, 0.847)	0.012 ^b (0.011, 0.038)	0.072 ^{b*} (0.059, 0.076)	ND	ND	ND
	Plasma	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.001 ^o (0.001, 0.004)	ND	0.004 (0.001, 0.010)	2.179 ^a (1.831, 2.368)
Elefante marino del norte	Eritrocitos	ND	0.062 ^{b*} (0.043, 0.070)	ND	0.131 ^b (0.114, 0.172)	0.329 ^{b*} (0.302, 0.373)	0.679 [*] (0.560, 0.808)	ND	0.046 ^{b*} (0.044, 0.055)	ND	ND	ND
	Plasma	ND	ND	ND	ND	0.012 ^o (0.011, 0.013)	ND	ND	0.002 ^o (0.002, 0.010)	0.002 ^b (0.002, 0.037)	0.002 (0.002, 0.002)	0.304 ^b (0.034, 0.474)
	Músculo	2.839 (2.086, 4.989)	0.284 [†] (0.180, 0.354)	ND	0.159 ^d (0.130, 0.171)	4.434 ^{d†} (3.414, 4.975)	0.098 ^{b†} (0.071, 0.124)	ND	0.184 ^{d†} (0.147, 0.199)	ND	ND	ND

Los resultados se presentan como mediana y percentiles (25%,75%). ND= por debajo del límite de detección. Letras diferentes (a, b, c, d) denotan diferencias significativas entre especies; símbolos diferentes (*, °, †) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie.

En el elefante marino del norte, el tejido en el que se detectó mayor número de compuestos purínicos fue el músculo (HX, NAD⁺, AMP, ADP, ATP y GTP), seguido de eritrocitos (NAD⁺, AMP, ADP, ATP y GTP) y plasma (ADP, GTP, inosina, adenosina y ácido úrico). La concentración de NAD⁺ fue significativamente mayor en músculo que en eritrocitos ($p=0.004$) (Tabla IV, Fig. 8). No se observaron diferencias significativas en la concentración de AMP entre músculo y eritrocitos ($p=0.695$) (Tabla IV, Fig. 10). La concentración de ADP fue significativamente mayor en músculo que en plasma ($p=0.004$) y eritrocitos ($p=0.004$) (Tabla IV, Fig. 11). De manera similar, la concentración de ADP fue significativamente mayor en eritrocitos que en plasma ($p<0.001$) (Tabla IV, Fig. 11). La concentración de ATP fue significativamente mayor en eritrocitos que en músculo ($p=0.004$) (Tabla IV, Fig. 12). La concentración de GTP fue significativamente mayor en músculo que en eritrocitos ($p=0.004$) y plasma ($p=0.004$), y en eritrocitos que en plasma ($p<0.001$) (Tabla IV, Fig. 14).

7.5.2 Comparación por tejido entre especies

En eritrocitos, la concentración de HX fue significativamente mayor en cerdo doméstico que en nutria neotropical ($p=0.004$) (Tabla IV, Fig. 7). La concentración de NAD⁺ fue significativamente mayor en elefante marino del norte en comparación con cerdo doméstico ($p<0.001$) y nutria neotropical ($p=0.004$) (Tabla IV, Fig. 8). No se observaron diferencias significativas en la concentración de NAD⁺ en eritrocitos entre cerdo doméstico y nutria neotropical ($p=0.987$) (Tabla IV, Fig. 8). La concentración de IMP fue significativamente mayor en cerdo doméstico que en nutria neotropical ($p=0.004$) (Fig. 9). La concentración de AMP fue significativamente mayor en eritrocitos de cerdo doméstico que en nutria neotropical ($p<0.001$) y elefante marino del norte ($p<0.001$) (Tabla IV, Fig. 10). No se encontraron diferencias significativas en eritrocitos entre nutria neotropical y elefante marino del norte ($p=0.891$) (Tabla IV, Fig. 10). La concentración de ADP en eritrocitos fue significativamente mayor en cerdo doméstico que en nutria neotropical ($p<0.001$) y elefante marino del norte ($p<0.001$) (Tabla IV, Fig. 11). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de ADP en eritrocitos entre nutria neotropical y elefante marino del norte ($p=0.873$) (Tabla IV, Fig. 11). La concentración de ATP en eritrocitos se observó con

el siguiente patrón, cerdo doméstico > nutria neotropical > elefante marino del norte; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las especies estudiadas ($p > 0.5$) (Tabla IV, Fig. 12). La concentración de GDP en eritrocitos fue significativamente mayor en cerdo doméstico que en nutria neotropical ($p = 0.037$) (Tabla IV, Fig. 13). La concentración de GTP fue significativamente mayor en eritrocitos de cerdo doméstico que de nutria neotropical ($p = 0.001$) y elefante marino del norte ($p < 0.001$) (Tabla IV, Fig. 14). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de GTP entre nutria neotropical y elefante marino del norte ($p = 0.76$) (Tabla IV, Fig. 14).

En plasma, la mayoría de los compuestos purínicos detectados en plasma se presentaron en concentraciones relativamente bajas. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de GTP (Tabla IV, Fig. 14) y adenosina (Tabla IV, Fig. 16) en plasma de elefante marino del norte y nutria neotropical, ni en la concentración de ADP (Tabla IV, Fig. 11) en plasma de cerdo doméstico y elefante marino del norte. La concentración de inosina en plasma fue significativamente mayor en cerdo doméstico que en elefante marino del norte ($p = 0.023$) (Tabla IV, Fig. 15). La concentración de ácido úrico en plasma fue significativamente mayor en nutria neotropical que en elefante marino del norte ($p = 0.004$) (Tabla IV, Fig. 17).

En músculo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de HX entre cerdo doméstico y elefante marino del norte ($p > 0.1$) (Tabla IV, Fig. 7). Las concentraciones de NAD^+ (Tabla IV, Fig. 8), AMP (Tabla IV, Fig. 10), ADP (Tabla IV, Fig. 11), ATP (Tabla IV, Fig. 12) y GTP (Tabla IV, Fig. 14) en músculo fueron significativamente mayores en cerdo doméstico que en elefante marino del norte ($p < 0.05$).

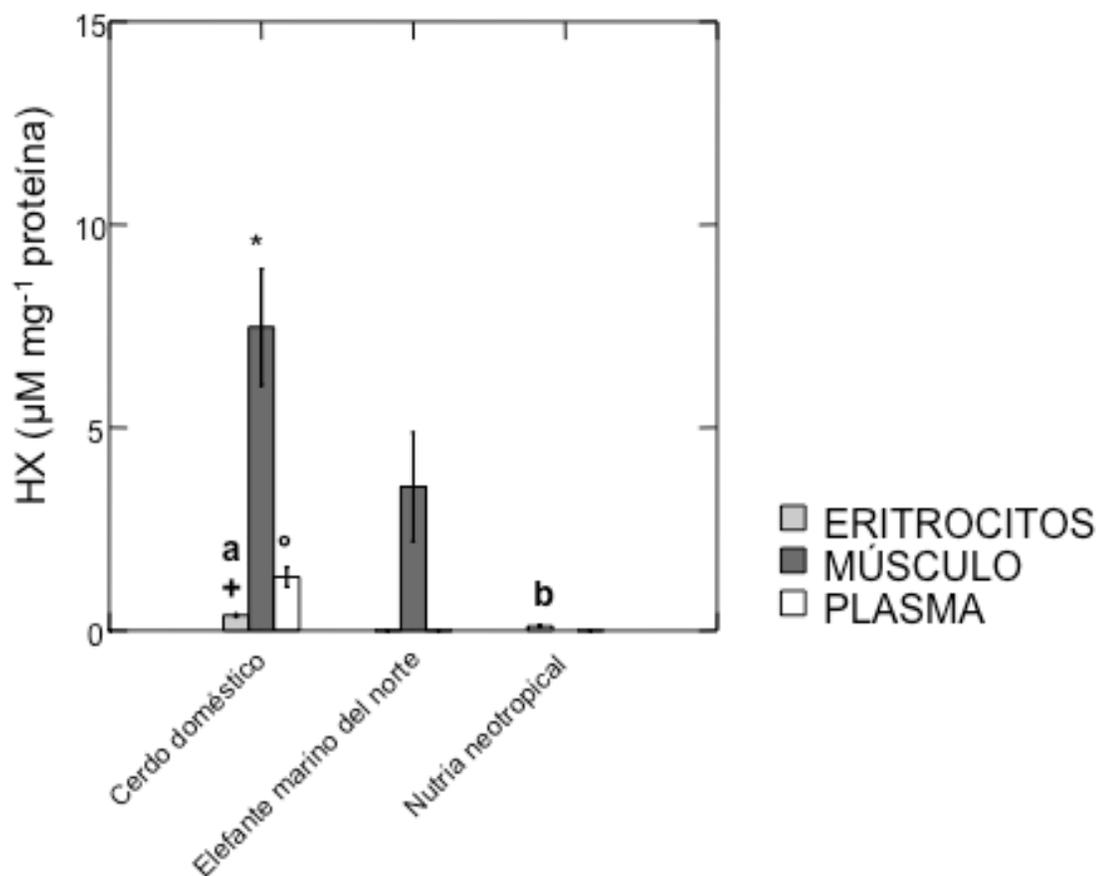


Figura 7. Concentración de hipoxantina (HX, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico ($n= 11$), elefante marino del norte ($n= 11$) y nutria neotropical ($n= 4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +, °) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p<0.05$).

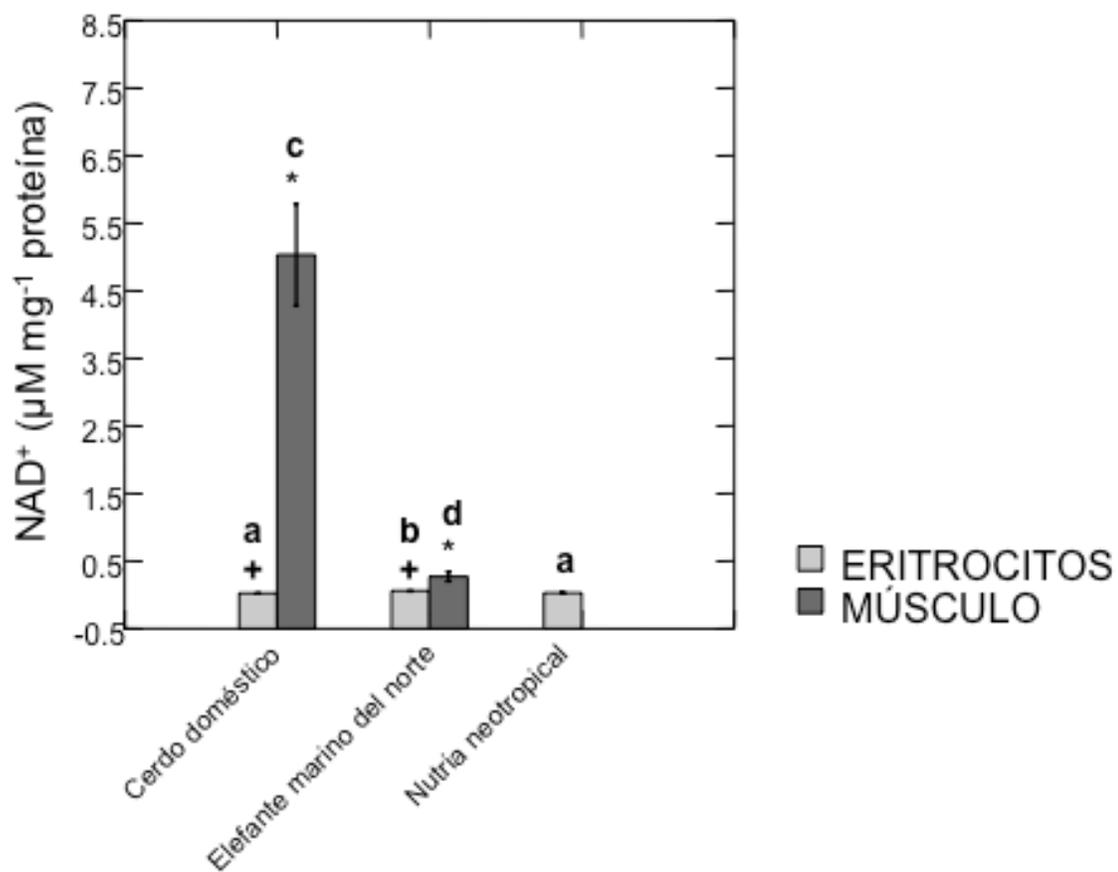


Figura 8. Concentración de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺, µM mg⁻¹ proteína) en los tejidos de cerdo doméstico (n= 11), elefante marino del norte (n= 11) y nutria neotropical (n= 4). Los datos se presentan como media ± error estándar. Las letras diferentes (a, b, c, d) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie (p<0.05).

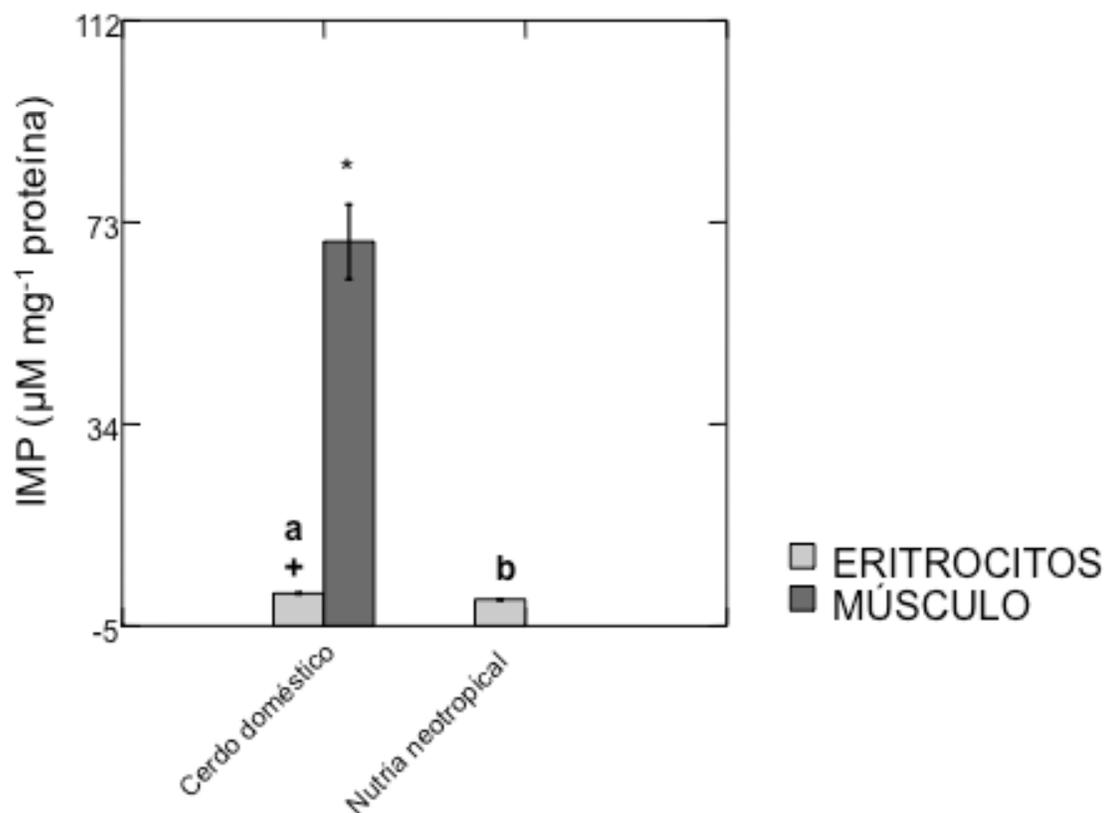


Figura 9. Concentración de inosina 5'-monofosfato (IMP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico ($n= 11$) y nutria neotropical ($n= 4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p<0.05$).

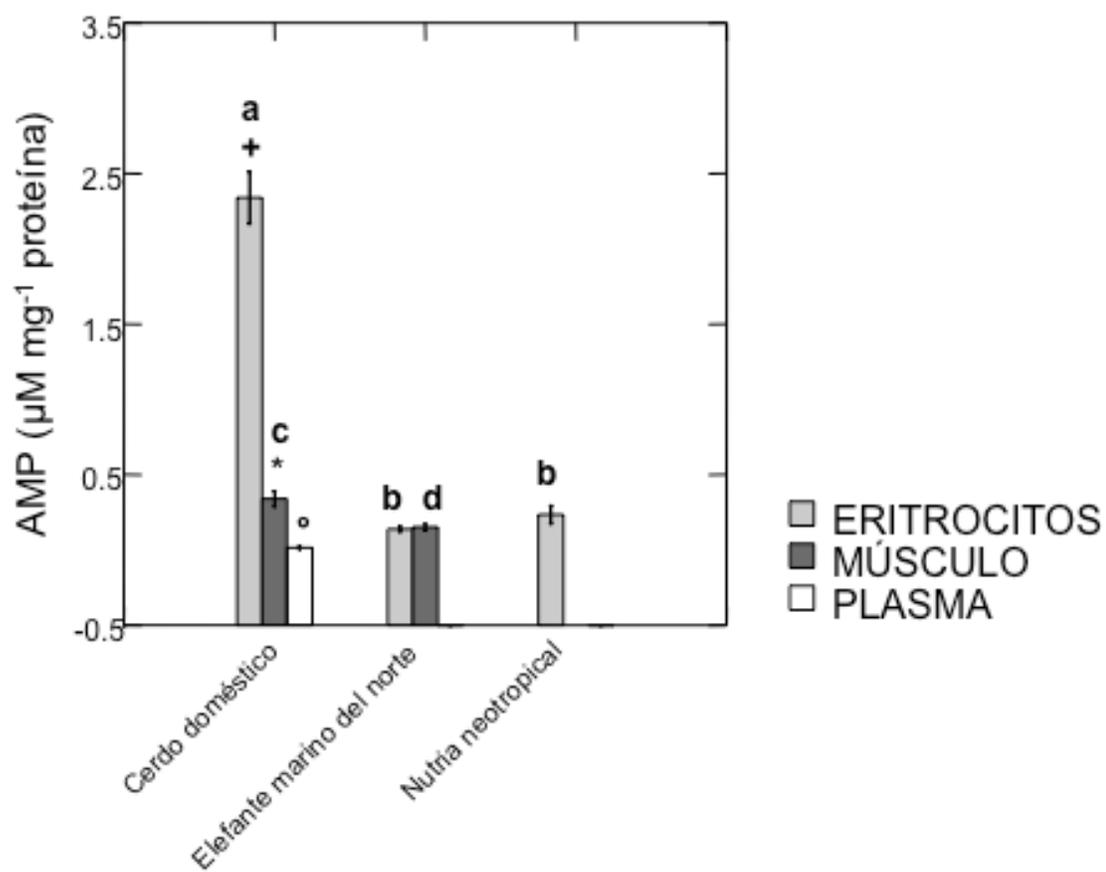


Figura 10. Concentración de adenosina 5'-monofosfato (AMP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico ($n= 11$), elefante marino del norte ($n= 11$) y nutria neotropical ($n= 4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b, c, d) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +, °) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p<0.05$).

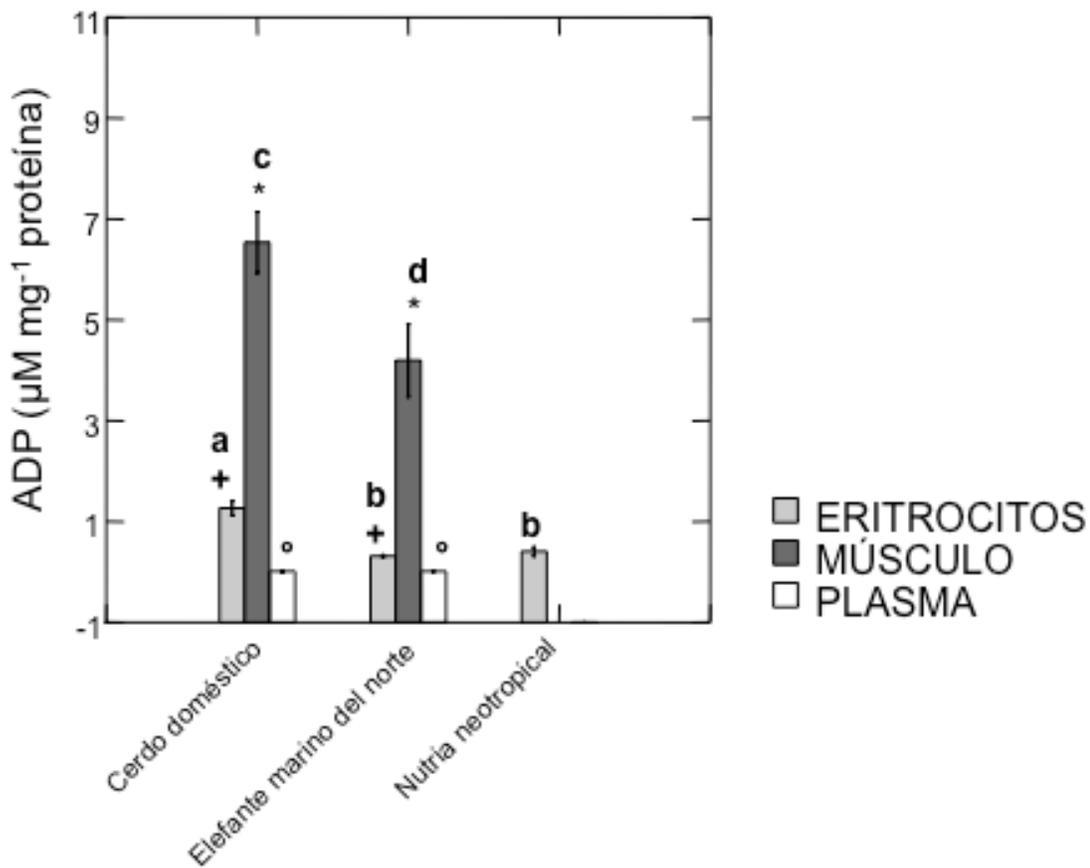


Figura 11. Concentración de adenosina 5'-difosfato (ADP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico ($n=11$), elefante marino del norte ($n=11$) y nutria neotropical ($n=4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b, c, d) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +, °) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p<0.05$).

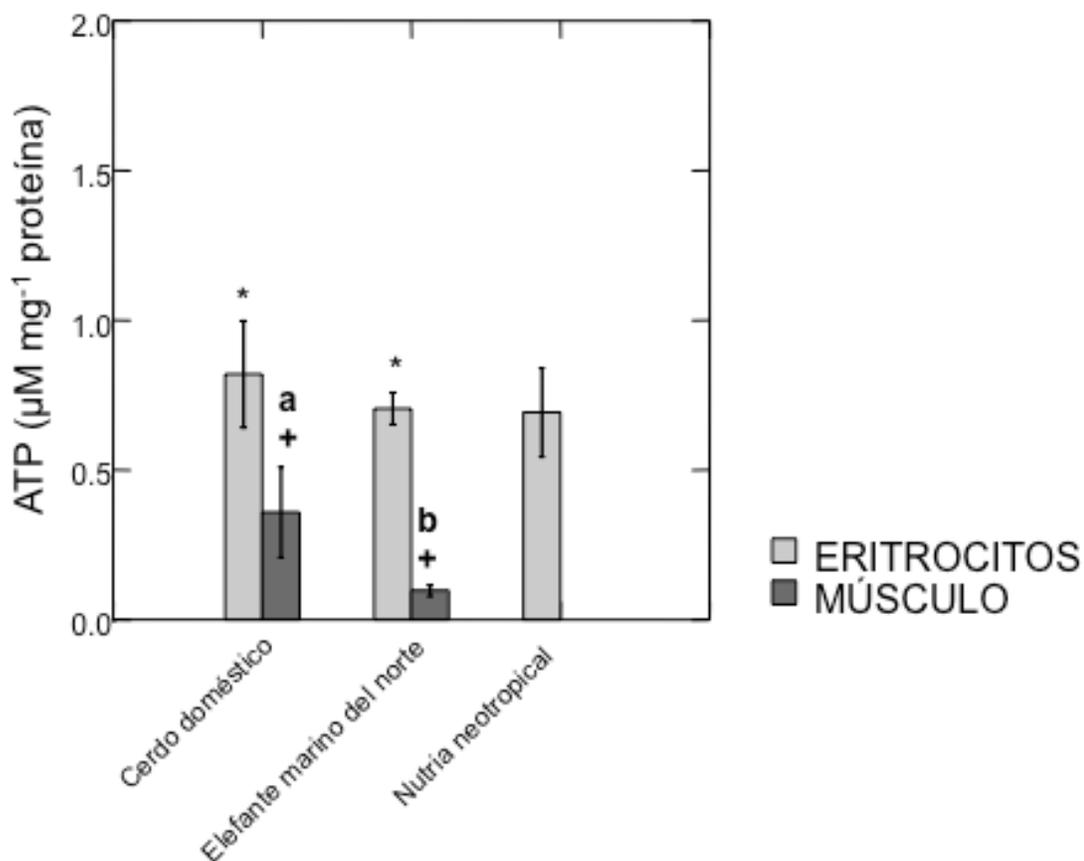


Figura 12. Concentración de adenosina 5'-trifosfato (ATP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en tejidos de cerdo doméstico ($n=11$), elefante marino del norte ($n=11$) y nutria neotropical ($n=4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p<0.05$).

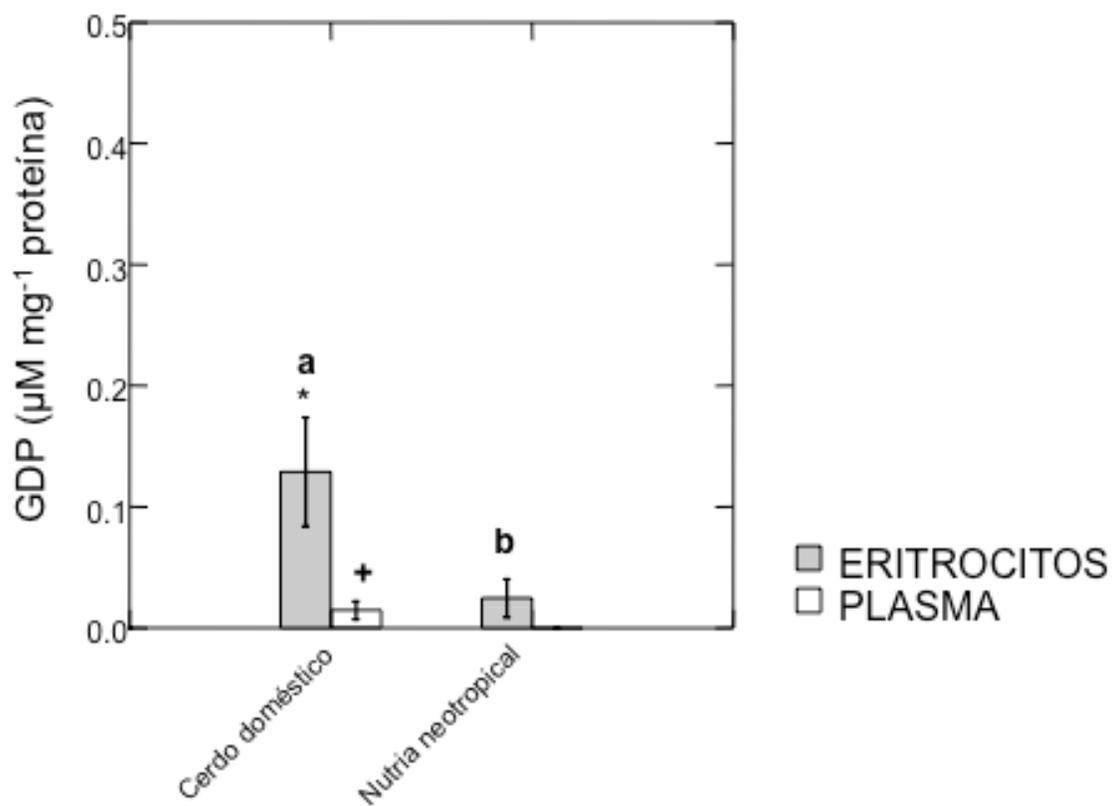


Figura 13. Concentración de guanosina 5'-difosfato (GDP, µM mg⁻¹ proteína) en los tejidos de cerdo doméstico (n= 11) y nutria neotropical (n= 4). Los datos se presentan como media ± error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie (p<0.05).

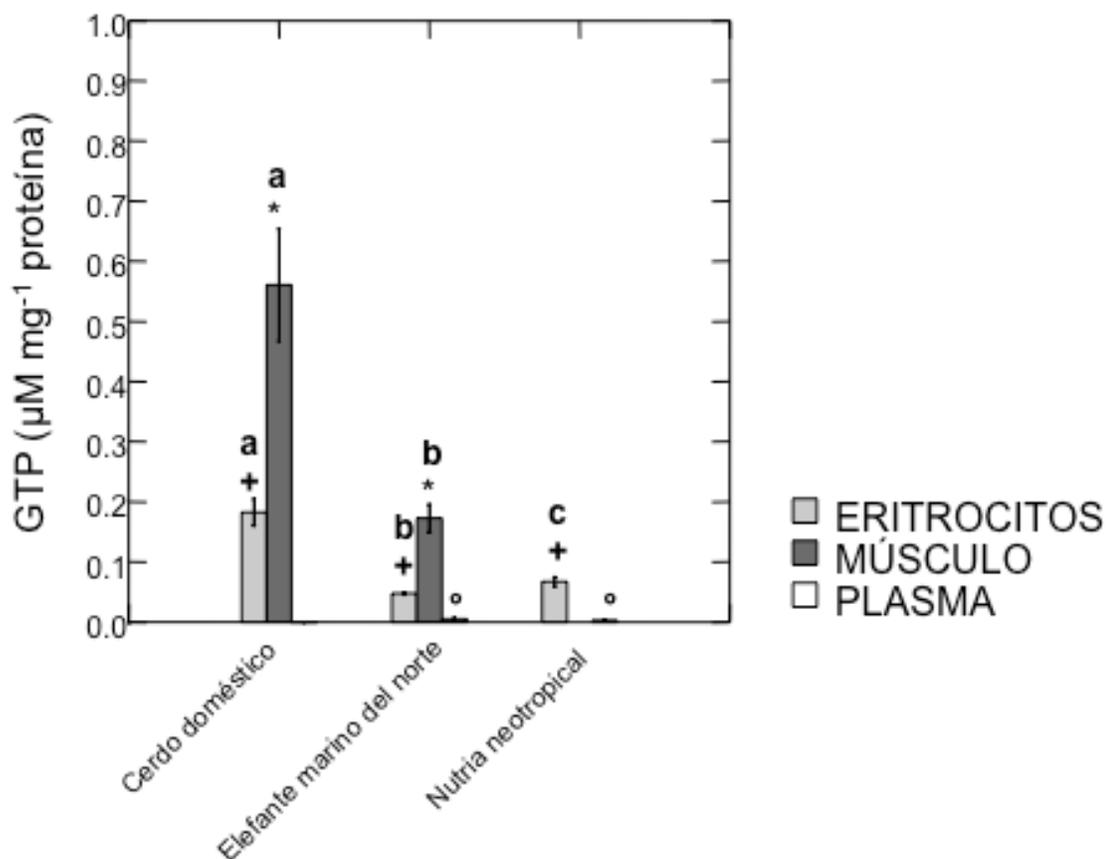


Figura 14. Concentración de guanosina 5'-trifosfato (GTP, $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en los tejidos de cerdo doméstico ($n= 11$), elefante marino del norte ($n= 11$) y nutria neotropical ($n= 4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b, c, d) denotan diferencias significativas entre especies; los símbolos (*, +, °) denotan diferencias significativas entre tejidos de una misma especie ($p<0.05$).

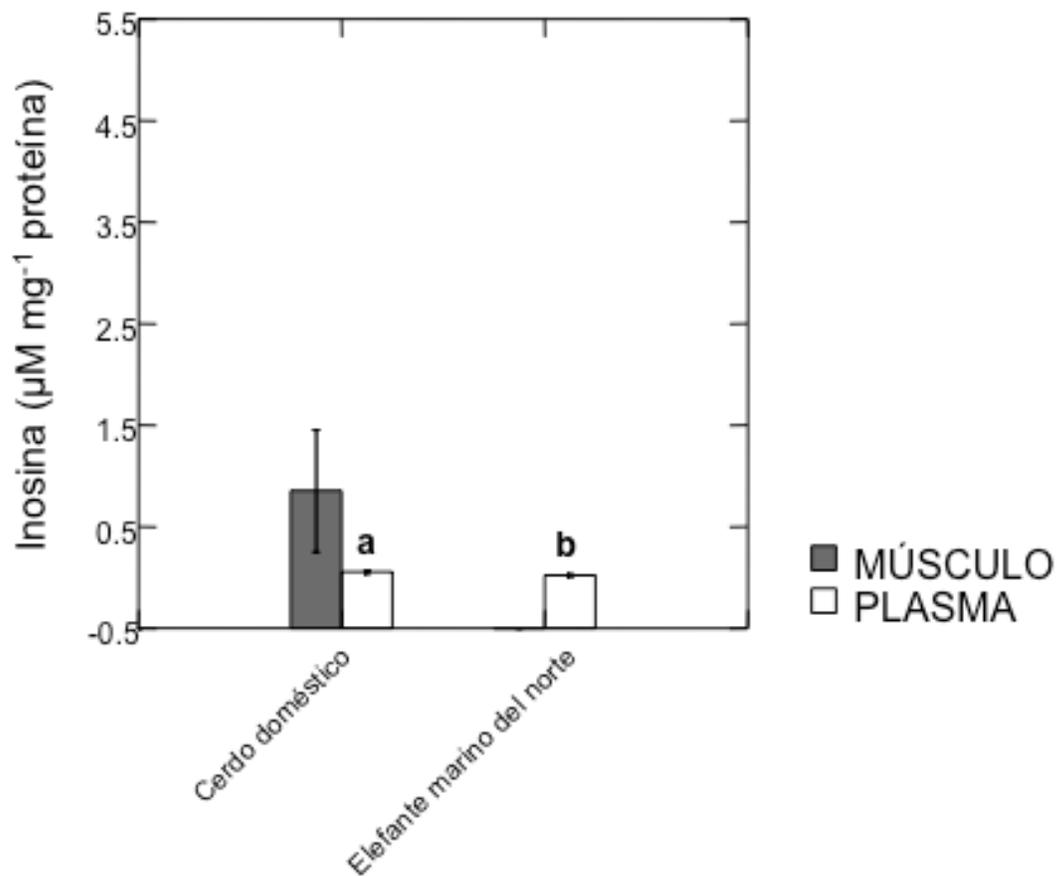


Figura 15. Concentración de inosina ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en los tejidos de cerdo doméstico ($n= 11$) y elefante marino del norte ($n= 11$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies ($p<0.05$).

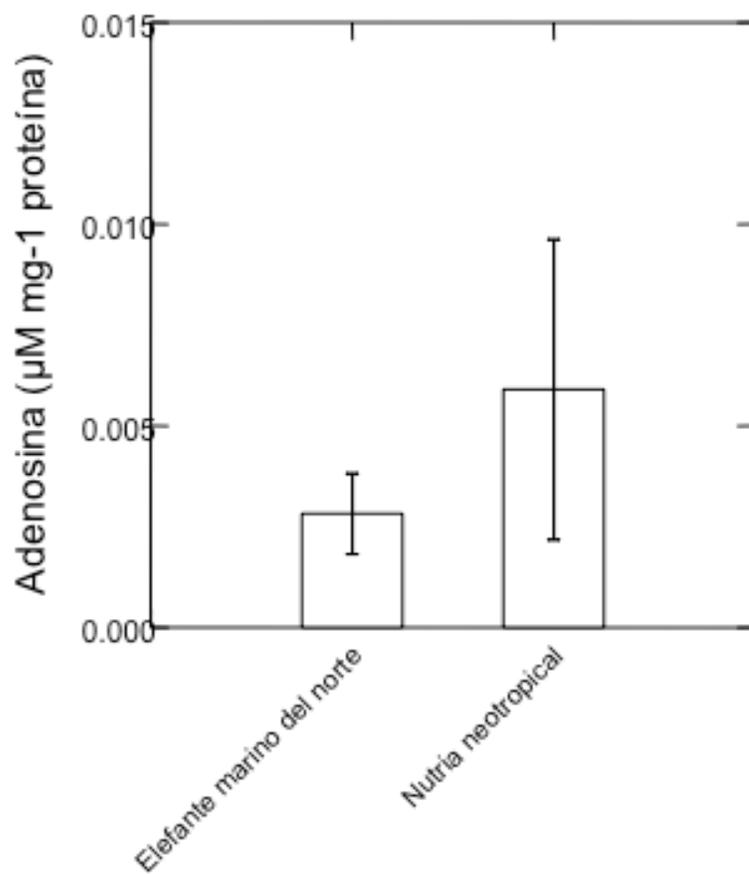


Figura 16. Concentración de adenosina ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en plasma de elefante marino del norte ($n=11$) y nutria neotropical ($n=4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar.

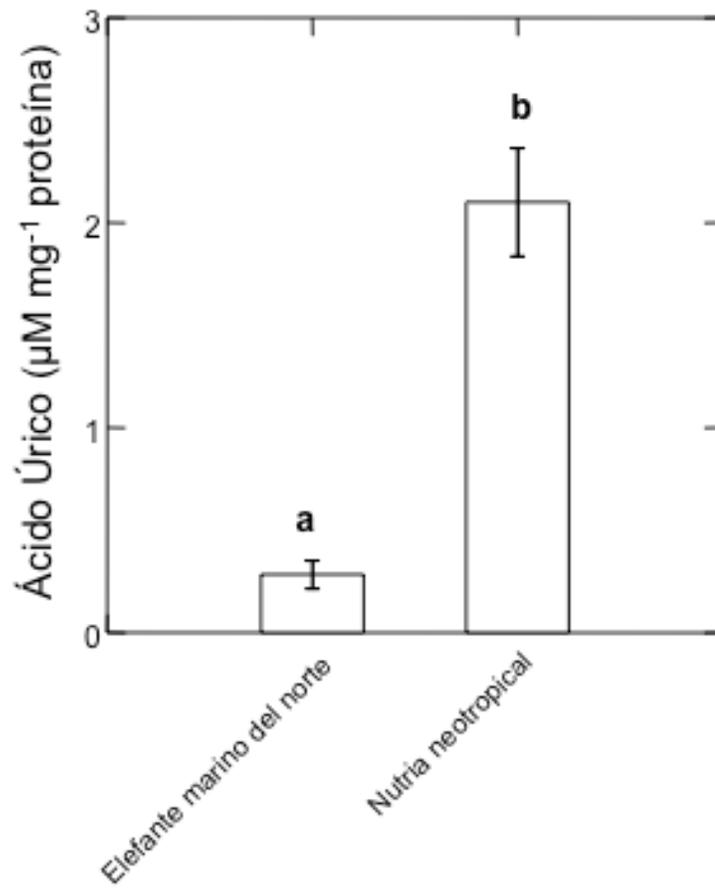


Figura 17. Concentración de ácido úrico ($\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) en plasma de elefante marino del norte ($n= 11$) y nutria neotropical ($n= 4$). Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes (a, b) denotan diferencias significativas entre especies ($p<0.05$).

8. DISCUSIÓN

La historia natural de los mamíferos acuáticos, semiacuáticos y terrestres define el grado de tolerancia de estos organismos hacia eventos de hipoxia e isquemia. Los mamíferos acuáticos, como el elefante marino del norte, poseen mecanismos cardiovasculares y fisiológicos que les permiten tolerar períodos prolongados de apneas asociadas a buceos y al sueño (Butler y Jones, 1997; Elsner *et al.*, 1998; Costa, 1999; Ponganis *et al.*, 2011; Panneton, 2013).

8.1. Hematocrito

El Hct de cerdo doméstico obtenido en este trabajo ($35.63 \pm 2.67\%$, Fig. 2), coincide con los valores de referencia reportados para esta especie. En cerdo doméstico recién nacido se reportan valores de Hct de 39.8 a 40.3%, similares a los de individuos juveniles (seis meses, 38 a 40%) y adultos (un año, 40 a 42%) (Miller *et al.*, 1961). El Hct obtenido en este trabajo para elefante marino del norte de ocho meses de edad ($54.63 \pm 1.58\%$, Fig. 2) es consistente con los valores de referencia en juveniles saludables (49 a 69%) muestreados en temporada reproductiva y de muda (Yochem *et al.*, 2008), en individuos de ocho meses de edad que regresan de su primer viaje de alimentación ($58.1 \pm 6.5\%$) (Thornson y Le Boeuf, 1994), en individuos de un año de edad (65.3%) (Hedrick *et al.*, 1986), en crías de cinco a ocho meses de edad durante períodos de eupnea ($53 \pm 5.0\%$) y apnea (47 a 67%) (Stockard *et al.*, 2007), y hembras adulto al inicio (50 a 64%) y al final (57 a 71%) del ayuno (Castellini y Castellini, 1993). El Hct obtenido en el presente trabajo para la nutria neotropical fue de $50.25 \pm 0.62\%$ (Fig. 2). Aunque no hay reportes de Hct de la nutria neotropical; en adultos de la especie *Lutra canadensis* (clínicamente saludables) el Hct es de 20 a 65% (mediana 35%) (Kimber y Kollias, 2005) y en adultos de la especie *Lutra lutra* se han reportado valores de Hct de 37.8 a 69.1% (promedio 54.6%) (Fernández-Morán *et al.*, 2001). Por lo tanto, el Hct de nutria neotropical obtenido en el presente trabajo, se encuentra dentro del rango reportado para adultos de especies congéneres y es, inclusive, similar al Hct reportado para la nutria marina (*Enhydra lutris*) de 36.10 a 68.10% (mediana 56.30%). El Hct en muestras de sangre de nutria neotropical es similar al de elefante marino del norte en el presente trabajo. Se ha sugerido que los valores de Hct de

nutria marina son similares a los reportados para pinnípedos y cetáceos (Williams y Pulley, 1983). Se ha reportado que en oso polar (*Ursus maritimus*), una especie considerada como mamífero marino por sus hábitos alimenticios marinos (Ramsay y Hobson, 1991; Iversen *et al.*, 2013) pero con hábitos semiacuáticos como las nutrias (MacArthur, 1989), el valor de Hct es mayor en individuos en cautiverio que en individuos de vida libre (Bossart *et al.*, 2001). Por lo tanto, se sugiere hacer un estudio comparativo del Hct, y en general de la hematología, de la nutria neotropical en cautiverio y vida libre.

Los mamíferos acuáticos tienen un Hct mayor que el reportado para especies terrestres (Hedrick *et al.*, 1986), lo cual coincide con los valores de Hct reportados en el presente trabajo para elefante marino del norte, nutria neotropical y cerdo doméstico (Fig. 2). Los valores de Hct son variables dependiendo de las condiciones fisiológicas del animal, si se encuentran en temporada de muda o reproducción, clase de edad, e incluso el mismo manejo del animal al momento de la toma de muestra (Castellini *et al.*, 2006; Yochem *et al.*, 2008), y se ha reportado que aumenta durante el ejercicio en caballos de carreras (Persson *et al.*, 1973). Este aumento se atribuye a la contracción del bazo y liberación de eritrocitos oxigenados (Schagatay *et al.*, 2007). Las focas, y en general los mamíferos acuáticos, tienen un bazo y volumen sanguíneo mayores que los mamíferos terrestres (Fujise *et al.*, 1985; Ponganis *et al.*, 1992; Castellini y Castellini, 1993; Thomson y Le Boeuf, 1994; Thornton y Hochachka, 2004). En elefante marino del norte el volumen sanguíneo es superior al 20% de su peso corporal, el más alto reportado para un mamífero (Simpson *et al.*, 1970). Los eritrocitos de mamíferos marinos son más grandes que los de mamíferos terrestres, la foca capuchina posee eritrocitos 60% más grandes que el humano (Reidarson *et al.*, 2000). Cambios en el estado de hidratación del organismo (deshidratación e hiperhidratación) pueden modificar los fluidos vasculares (Jiménez *et al.*, 1999), y por ende el Hct. El cerdo doméstico pasa por dos períodos de anemia (Miller *et al.*, 1961); al nacer, justo después de consumir el calostro (leche materna inicial), el incremento en proteínas séricas induce un incremento en el volumen de plasma y una disminución de Hct de 39 a 40% hasta 30 a 32%. En el segundo período anémico, a las cinco o seis semanas de edad y debido a la disminución del aporte de hierro (utilizado en la biosíntesis de Hb) por la transición de leche materna a alimento de granja, los valores de Hct del cerdo doméstico

disminuyen hasta 30.4 a 31.2%. Sin embargo, aproximadamente una semana después, el Hct regresa a sus valores iniciales (aproximadamente 38%) debido al proceso de eritropoiesis y por la acción de la eritropoietina que se produce en el riñón (Jacobsen *et al.*, 1956). Durante el período de ayuno post-destete en crías de elefantes marinos, el Hct puede incrementar de 51% justo después del destete, hasta 58.1% cuando regresan a la colonia después de su primer viaje de alimentación (Thornson y Le Boeuf, 1994).

8.2. Actividad enzimática

8.2.1. Purina nucleósido fosforilasa (PNP, E.C. 2.4.2.1)

La actividad de PNP en eritrocitos de cerdo doméstico en el presente estudio (mediana 29.12 U mg⁻¹ proteína) (Tabla III, Fig. 3), concuerda con lo reportado previamente en eritrocitos de cerdo doméstico y de otros mamíferos terrestres. La actividad de PNP en eritrocitos de cerdo doméstico se ha reportado de 80 a 110 U mL⁻¹ de eritrocitos, en humano de 87 a 112 U mL⁻¹ de eritrocitos, siendo mayores que aquellas reportadas para conejos (60 U mL⁻¹ de eritrocitos) y pollos (10 U mL⁻¹ de eritrocitos) (Sandberg *et al.*, 1955). La mayor actividad de PNP en eritrocitos de cerdo doméstico que de elefante marino del norte en el presente estudio concuerda con una mayor actividad de PNP reportada en eritrocitos de mamífero terrestre (humano) que en mamíferos acuáticos (tonina, *Tursiops truncatus*) (la actividad de PNP de tonina es 7.4% de aquella detectada en humano) (Craik *et al.*, 1997), y que la reportada por López-Cruz *et al.* (2014) es 18.21 ± 4.25 U mg⁻¹ proteína en humano vs. 11.83 ± 4.82 U mg⁻¹ proteína en tonina. La actividad de PNP en músculo (Tabla III, Fig. 3) fue mayor en muestras de cerdo doméstico que de elefante marino del norte, en cerdo doméstico fue menor que la observada en eritrocitos, mientras que en elefante marino del norte, la actividad de PNP fue mayor en músculo que en eritrocitos. En músculo esquelético de humano se ha reportado que la actividad de PNP es de 2552 ± 328 nmol g⁻¹ proteína min⁻¹ (Schopf *et al.*, 1986). No hay reportes de la actividad de PNP en músculo de las tres especies analizadas en el presente trabajo.

La actividad de PNP en plasma de cerdo doméstico y elefante marino del norte, siguiendo el protocolo de Chu *et al.* (1989), estuvo por debajo del límite de detección; en plasma de nutria neotropical la actividad de PNP fue de 0.105 U mg⁻¹ proteína, menor que lo obtenido

en eritrocitos y músculo de cerdo doméstico y elefante marino del norte (Tabla III, Fig. 3). Dado que la actividad de PNP en plasma es relativamente baja, se sugiere utilizar un método más sensible, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Utilizando HPLC en plasma de humano, la actividad de PNP se reporta en $3.26 \pm 1.63 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Yamamoto *et al.*, 1995) y $3.2 \pm 1.4 \text{ U L}^{-1}$ (Roberts *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la actividad de PNP en plasma está asociada a procesos patológicos intracelulares que incrementan la degradación de purinas; en individuos con asma la actividad de PNP es $6.69 \pm 3.92 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Yamamoto *et al.*, 1995) y en individuos con cáncer es $12.3 \pm 7.4 \text{ U L}^{-1}$ (Roberts *et al.*, 2004).

8.2.2. Xantina oxidasa (XO, E.C. 1.17.3.2)

En eritrocitos de las tres especies (cerdo doméstico, nutria neotropical y elefante marino del norte) analizadas en el presente estudio, la actividad de XO estuvo por debajo del límite de detección. De manera general, la sangre es la principal reserva de oxígeno en los fócidos, ya que contiene aproximadamente 65% del total de oxígeno disponible unido a la Hb, seguido del músculo con 30% de oxígeno unido a la Mb (Thornson y Le Boeuf, 1994). Se ha reportado que la foca común (Kodama *et al.*, 1977; Burns *et al.*, 2004), el elefante marino del sur (Bryden y Lim, 1972) y el elefante marino del norte (Thornson y Le Boeuf, 1994) incrementan su volumen sanguíneo durante el período de ayuno post-destete y durante su primer viaje de alimentación. Al término del ayuno, el elefante marino del norte tiene reservas de oxígeno similares a las de adultos (66%) (Thornson, 1993). La mayor parte del hierro (>80%) en el organismo, esta unido a la Hb de la sangre, por lo tanto, cambios en los niveles de eritrocitos pueden alterar la cantidad de hierro disponible (Van Eijk y De Jong, 1992). Los mamíferos que bucean tienen mayor concentración de Hb y Mb y mayor volumen sanguíneo que los mamíferos terrestres (Thornson y Le Boeuf, 1994); por lo tanto, se espera que la concentración de hierro disponible sea mayor en elefante marino del norte que en nutria neotropical y en cerdo doméstico. El hierro del grupo hemo de la Hb suprime a los compuestos fluorescentes, como el Amplex®Red utilizado en este estudio, evitando la formación de la resorufina e interfiriendo con la detección de la actividad de XO (Molecular Probes, comunicación personal). Una alternativa para analizar la actividad

de XO en eritrocitos es medir la tasa de formación del ácido úrico a 295 nm (Kooij *et al.*, 1994).

En músculo, la actividad de XO de elefante marino del norte (mediana 0.060 mU mg⁻¹ proteína) fue mayor que la de cerdo doméstico (mediana 0.052 mU mg⁻¹ proteína). La actividad de XO en músculo de cerdo doméstico y elefante marino del norte fue mayor a la reportada en plasma de ambas especies (Tabla III, Fig. 4). Las actividades enzimáticas detectadas en plasma son resultado del incremento de expresión protéica y actividad a nivel intracelular (Yamamoto *et al.*, 1995; Soñanez-Organis *et al.*, 2012). No se conocen reportes de la actividad de XO en músculo de las especies analizadas en este trabajo; sin embargo, se ha reportado la presencia de XO en músculo esquelético de humano (Hellsten *et al.*, 1997) y de rata (3.22 mU g⁻¹ de tejido) (Judge y Dodd, 2004). Se sugiere que la actividad de XO incrementa como resultado del ejercicio intenso.

La actividad de XO en plasma de elefante marino del norte en el presente trabajo es similar a lo reportado por Vázquez-Medina *et al.* (2011) (1.5 mU mL⁻¹). En elefante marino del norte se reporta un incremento de la actividad de XO en respuesta a las apneas del sueño (1.4 mU mL⁻¹) y del buceo (1.6 mU mL⁻¹) (Vázquez-Medina *et al.*, 2011). La actividad de XO en plasma de elefante marino del norte en este trabajo fue mayor a lo reportado por Vázquez-Medina *et al.* (2011). Es posible que esta diferencia se deba a que los individuos muestreados en el presente trabajo tenían ocho meses de edad y regresaban de su primer viaje de alimentación y buceo y eran, por lo tanto, individuos de mayor tamaño y con mayor capacidad de buceo (10 a 15 minutos para individuos de elefante marino del norte de ocho meses de edad; Thornson y Le Boeuf, 1994) en comparación con las crías (seis minutos para crías de 10 a 11 semanas de edad; Thornson y Le Boeuf, 1994) como las reportadas por Vázquez-Medina *et al.* (2011). Soñanez-Organis *et al.* (2012) reportan un incremento significativo en la actividad de XO en plasma de elefante marino del norte a lo largo de siete semanas de ayuno post-destete, y lo relacionan con un aumento en la degradación de ATP durante la ausencia de alimento y las condiciones hipóxicas asociadas a la apnea del sueño. El ayuno post-destete de los elefantes marinos del norte se caracteriza por la falta de ingesta de alimento y por el incremento en el número y duración de las

apneas del sueño, que normalmente duran de 8 a 12 min (Blackwell y Le Boeuf, 1993; Castellini *et al.*, 1994).

La actividad de enzimas catabólicas como PNP y XO en plasma tanto de mamíferos acuáticos como terrestres aumenta durante procesos como hipoxia, isquemia y ayuno que provocan degradación de nucleótidos (Yamamoto *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 2004; Soñanez-Organis *et al.*, 2012).

8.2.3. Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT, E.C. 2.4.2.8)

La actividad de HGPRT en eritrocitos y plasma de cerdo doméstico (1.31 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹ y 0.026 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹, respectivamente) fue mayor a las actividades en eritrocitos y plasma de elefante marino del norte (0.035 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹ y 0.015 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹, respectivamente) y en eritrocitos y plasma de nutria neotropical (0.039 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹ y 0.013 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹, respectivamente) (Tabla III, Fig. 5). El 90% de las purinas libres (como la HX y guanina) son recicladas en humanos (Stout y Caskey, 1985). La actividad de HGPRT en eritrocitos de humano se ha reportado de 69 a 96 U mg⁻¹ proteína (Elder y Johnson, 1983), mayor que en caballo, perro y rata (Tax *et al.*, 1976). Se sugiere que la mayor actividad de HGPRT en humano que en caballo, perro y rata está asociada a una eficiente capacidad de reciclado de purinas en los eritrocitos.

Es posible que, con base en la menor actividad circulante de HGPRT en elefante marino del norte y nutria neotropical que en cerdo doméstico (este estudio), la capacidad de reciclado de purinas en mamíferos acuáticos y semiacuáticos sea menor que en mamíferos terrestres.

La actividad de HGPRT en plasma de elefante marino del norte a los ocho meses de edad (este estudio) es menor que en crías de 10 a 11 semanas de edad (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). Durante el ayuno post-destete aumenta la actividad de HGPRT en plasma de elefante marino del norte (5.5 μmol μL⁻¹ de plasma min⁻¹ al inicio del ayuno, a 9 μmol μL⁻¹ de plasma min⁻¹ a las siete semanas después del destete), sugiriendo que en este período hay aumento en la degradación de nucleótidos y en el reciclado de purinas (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). En elefantes marinos, la capacidad aerobia, la capacidad de buceo y la duración de las apneas del sueño incrementan con la masa corporal y con la edad (Blackwell y Le Boeuf, 1993; Thornson y Le Boeuf, 1994; Schreer y Kovacs, 1996; Irvine *et al.*, 2000;

Burns *et al.*, 2005). Se recomienda un estudio más detallado de la actividad de HGPRT en mamíferos acuáticos, semiacuáticos y terrestres para evaluar posibles diferencias por edad, en respuesta a retos (como el ayuno, la muda o apneas del buceo), y bajo condiciones fisiopatológicas que inducen isquemia e hipoxia.

8.2.4. Inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH, E.C. 1.1.1.205)

En el presente estudio, la actividad de IMPDH en eritrocitos de cerdo doméstico (mediana 37.24 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹), fue mayor que en nutria neotropical (mediana 36.92 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹, NS) y elefante marino del norte (mediana 14.06 nmol mg⁻¹ proteína h⁻¹, p=0.011) (Tabla III, Fig. 6). No se tiene conocimiento de otros reportes de la actividad de IMPDH en las tres especies analizadas en este trabajo. En eritrocitos de humano, la actividad de IMPDH es 85 pmol mg⁻¹ proteína h⁻¹ en individuos sanos, y en individuos con desórdenes del metabolismo de purinas (deficiencia de HGPRT y PNP) aumenta a 234 pmol mg⁻¹ proteína h⁻¹ y 126 pmol mg⁻¹ proteína h⁻¹, respectivamente (Montero *et al.*, 1995).

8.3. Concentración de nucleótidos y metabolitos purínicos

En cerdo doméstico se detectaron ocho metabolitos y nucleótidos, así como NAD⁺ (Tabla IV, Fig. 7-15). Los metabolitos HX e inosina y nucleótidos como AMP, ADP y GDP detectados en plasma de cerdo doméstico generalmente se asocian a la degradación de purinas (Grum *et al.*, 1985). En eritrocitos y músculo de cerdo doméstico se detectaron metabolitos de degradación como HX e inosina, así como nucleótidos (IMP, AMP, ADP, ATP, GDP y GTP). Lo anterior coincide con lo reportado para eritrocitos de humano (HX, 284 μM; inosina, 85 μM; IMP, 100 μM; AMP, 12-247 μM; ATP, 1500-1800 μM), eritrocitos de conejo (HX, 13 μM; inosina, 2.5 μM; IMP, 50 μM; AMP, 40 μM; ATP, 1395 μM) y corazón e hígado de rata (HX, 138 μM; inosina, 0.2 μM; IMP, 10-114 μM; AMP, 6.8-450 μM; ATP, 2700-5100 μM) (Traut, 1994). La concentración de IMP y NAD⁺ que se detectó en músculo de cerdo doméstico, fue mayor a la de eritrocitos (en el presente estudio). En los tejidos analizados de elefante marino del norte se detectaron ocho metabolitos y nucleótidos, así como NAD⁺ (Tabla IV, Figs. 7, 8, 10 a 12, 14 a 17), mientras que en eritrocitos de nutria neotropical se detectaron nueve metabolitos y nucleótidos,

además de NAD⁺ (Tabla IV, Figs. 7 a 14, 16 y 17). Las concentraciones de bases y nucleótidos obtenidas en plasma de cerdo doméstico (HX, 1.463 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; IMP, ND; ADP, 0.010 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; GTP, ND), nutria neotropical (HX, ND; IMP, ND; ADP, ND; ATP, ND; GTP, 0.001 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) y elefante marino del norte (HX, ND; ADP, 0.012 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; GTP, 0.002 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína), son menores que en eritrocitos de cerdo doméstico (HX, 0.362 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; IMP, 1.034 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; ADP, 1.344 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; GTP, 0.175 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína), nutria neotropical (HX, 0.113 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; IMP, 0.100 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; ADP, 0.406 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; GTP, 0.072 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) y elefante marino del norte (HX, ND; ADP, 0.329 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; GTP, 0.046 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) y éstas a su vez, son menores que en músculo de cerdo doméstico (HX, 6.163 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; IMP, 70.394 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; ADP, 6.458 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; GTP, 0.550 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) y elefante marino del norte (HX, 2.839 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; ADP, 4.434 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína; GTP, 0.184 $\mu\text{M mg}^{-1}$ proteína) (en el presente estudio).

Las bases y nucleósidos (HX, guanosina, adenosina e inosina) en plasma y otros fluidos extracelulares (humano, conejo y rata) se pueden encontrar en rangos de 0.4 a 6 μM , y usualmente son menores que las concentraciones intracelulares (en eritrocitos, placenta, hígado, corazón) (Traut, 1994). En plasma de elefante marino del norte y de nutria neotropical, a diferencia del cerdo doméstico, se detectó ácido úrico. Se ha reportado que el ácido úrico puede actuar como antioxidante (Ames *et al.*, 1981; Hellsten *et al.*, 1997) y/o como neuroprotector (Proctor, 2008; Álvarez-Lario y Macarrón-Vicente, 2010). Esta concentración de ácido úrico coincide con la actividad de XO detectada en plasma de elefante marino del norte (en el presente estudio). Es posible que el ácido úrico en plasma de elefante marino del norte y nutria neotropical contribuya a los mecanismos que permiten a los mamíferos acuáticos y semiacuáticos tolerar los eventos de hipoxia e isquemia resultado de las apneas del sueño y buceo.

Durante procesos de hipoxia en humanos enfermos de cáncer, cirrosis, neumonía, entre otras, hay un aumento en la degradación intracelular de ATP; las bases purínicas (adenosina, inosina, HX, xantina) generadas atraviesan la membrana celular y, por lo tanto, se acumulan en plasma y pueden servir como marcadores bioquímicos de degradación de

ATP (Grum *et al.*, 1985; Traut, 1994). Es posible que la mayor actividad de PNP en eritrocitos de cerdo doméstico que en elefante marino del norte y nutria neotropical, se deba a una alta permeabilidad de los eritrocitos a la inosina (utilizada como sustrato por la PNP) (Duhm, 1974); ello, además, podría sugerir que los eritrocitos de cerdo doméstico dependen de inosina como fuente de energía metabólica (en forma de 2,3-difosfoglicerato), ya que son incapaces de metabolizar glucosa (Sandberg *et al.*, 1955; Duhm, 1974; Jarvis *et al.*, 1980). Por el contrario, la menor actividad de PNP en eritrocitos de elefante marino del norte puede ser resultado de una alta permeabilidad a D-glucosa, lo que sugeriría que, al contrario del cerdo doméstico, esta especie sólo depende parcialmente de la inosina como sustrato generador de energía (Craik *et al.*, 1997).

La enzima HGPRT contribuye al reciclado de purinas a partir de HX y guanina (Stout y Caskey, 1985). La mayor concentración de HX (producto de la actividad de PNP) en respuesta a isquemia experimental en corazón y riñón de cerdo doméstico en comparación con aquellos de foca anillada (*Phoca hispida*) sugieren una mayor degradación de ATP en el primero (Elsner *et al.*, 1998). Esto coincide con una mayor concentración de HX (Tabla IV, Fig. 7) y mayor actividad de HGPRT (Tabla III, Fig. 5) en cerdo doméstico que en elefante marino del norte.

La actividad de HGPRT se acopla con la actividad de XO (que convierte HX a X) y la concentración de HX en plasma y eritrocitos de cerdo doméstico en este trabajo, sugiriendo la capacidad para generar energía y, simultáneamente, evitar la producción de radicales libres (Elsner *et al.*, 1998; Vázquez-Medina *et al.*, 2006; Vázquez-Medina *et al.*, 2011). Se ha reportado que en foca anillada hay mayor acumulación de radical $O_2^{\bullet-}$ (subproducto de la actividad de la enzima XO) que en cerdo doméstico. Se ha sugerido que la mayor acumulación de radical $O_2^{\bullet-}$ posiblemente provoca una respuesta adaptativa a la hipoxia en focas, incrementando su capacidad antioxidante (Zenteno-Savín *et al.*, 2002). Esto es consistente con la mayor actividad de XO en plasma y músculo de elefante marino del norte que de cerdo doméstico, obtenidas en el presente estudio.

En músculo esquelético de humano, aunque ocurre degradación de inosina a HX por la acción de la PNP (Schopf *et al.*, 1986), existe otra vía de conversión de IMP a AMP por

enzimas como la adenilosuccinato sintetasa (ADSS) y la adenilosuccinato liasa (ADSL), que se acoplan con la enzima AMP deaminasa (que convierte AMP a IMP) y cuya actividad es dominante en músculo esquelético, en comparación con la 5'-nucleotidasa que degrada IMP a inosina. La actividad dominante de la enzima AMP deaminasa en músculo, puede resultar en una gran acumulación de IMP en dicho tejido (Brault y Terjung, 2001). Esto no sólo es consistente con la mayor concentración de IMP obtenida en músculo de cerdo doméstico en el presente estudio, sino que la menor actividad de PNP en músculo de cerdo doméstico y elefante marino del norte en comparación con eritrocitos, posiblemente sea resultado de la poca disponibilidad de los sustratos, inosina y adenosina (Schopf *et al.*, 1986; Brault y Terjung, 2001). Los nucleósidos como adenosina e inosina y bases como la HX pueden cruzar las membranas celulares, favoreciendo la disminución de sus concentraciones en miocitos (Brault y Terjung, 2001). Esto es consistente con la menor concentración de inosina y adenosina detectada en músculo de cerdo doméstico y elefante marino del norte, en comparación con la obtenida en plasma (el presente estudio). La movilidad de inosina y la HX a través de membranas celulares aumenta durante procesos de degradación de nucleótidos, como ocurre durante el ejercicio intenso y procesos de isquemia en humanos (Hellsten *et al.*, 1999; Stathis *et al.*, 1999).

La síntesis de nucleótidos de guaninas (GMP, GDP y GTP) es esencial para el mantenimiento del crecimiento y la función celular, así como para la transformación celular y respuestas inmunes de los organismos. La actividad de la enzima IMPDH controla la síntesis *de novo* de los nucleótidos de guanina (Zimmermann *et al.*, 1998). La actividad de IMPDH en eritrocitos de cerdo doméstico y nutria neotropical es consistente con la mayor concentración de GDP y GTP detectada en eritrocitos en dichas especies, mientras que en eritrocitos de elefante marino del norte, la menor actividad de IMPDH es consistente con la menor concentración de GDP y GTP (el presente estudio).

El NAD⁺ es utilizado como cofactor por la enzima IMPDH (Sintchak y Nimmegern, 2000). La menor concentración de NAD⁺ detectada en eritrocitos de cerdo doméstico (mediana 0.023 µM) y nutria neotropical (mediana 0.025 µM), coincide con la mayor actividad de la IMPDH, mientras que la mayor concentración de NAD⁺ (mediana 0.062 µM) detectada en

eritrocitos de elefante marino del norte, es consistente con la menor actividad de dicha enzima.

Es posible que la actividad de HGPRT e IMPDH, así como las concentraciones de los nucleótidos, nucleósidos y bases purínicas en tejidos de elefante marino del norte, nutria neotropical y cerdo doméstico en el presente trabajo, estén relacionadas con el tipo de alimentación. Se ha reportado en humano una relación entre la cantidad de purinas exógenas obtenidas a través de la dieta y la síntesis de purinas (Cosgrove, 1998; Carver, 1999), sugiriendo que las purinas exógenas pueden ser incorporadas a los tejidos (en edades tempranas y/o condiciones de ayuno) o disminuir el costo energético de la síntesis *de novo* (Sonoda y Tatibana, 1978; Carver, 1999). Los individuos de cerdo doméstico y nutria neotropical analizados en el presente estudio son animales en cautiverio, con dietas controladas. El cerdo doméstico es un animal omnívoro que puede alimentarse de diferentes productos y subproductos de origen vegetal y animal, y puede ser explotado en forma tradicional con recursos limitados (dieta casera) o en forma intensiva, combinando técnicas de alimentación que permiten mejorar la calidad de su carne (Benítez-Ortíz y Sánchez, 2001). La nutria neotropical muestreada en este trabajo es alimentada con una dieta en la que predomina la proteína de origen animal (pescado, pollo y Mazuri® - alimento para animales exóticos con alto contenido de aminoácidos) (de la Rosa, A., comunicación personal) y, por lo tanto, con un alto contenido de purinas.

Los mamíferos acuáticos cuentan con mecanismos fisiológicos y anatómicos que les permiten tolerar períodos de apnea, isquemia e hipoxia asociados al buceo (Elsner, 1999; Panneton, 2013). Se esperaba encontrar mayor actividad de HGPRT en mamíferos que bucean que en mamíferos terrestres (Elsner *et al.*, 1998). En este estudio, la actividad de la enzima HGPRT en el mamífero acuático (elefante marino del norte) fue menor que en el mamífero terrestre (cerdo doméstico). Los elefantes marinos del norte analizados en este trabajo eran individuos de ocho meses de edad, que regresaron a su colonia a descansar y ayunar durante el otoño, después de su primer viaje de alimentación. Los cerdos domésticos y nutrias neotropicales incluidos en este estudio eran adultos, con una dieta controlada y con alto contenido protéico. Es posible que, ya que existe un desarrollo postnatal del buceo en mamíferos acuáticos (Thornson y Le Boeuf, 1994), las diferencias en edad y dieta entre

las especies de mamífero acuático, semiacuático y terrestre en este estudio hayan enmascarado posibles diferencias en la actividad de HGPRT y los metabolitos de las purinas asociados al buceo. Además, es importante integrar varios de los componentes enzimáticos y sus metabolitos para lograr una mejor interpretación del mecanismo de acción del metabolismo de purinas en mamíferos acuáticos. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados específicos de este trabajo no se puede concluir que el sistema de reciclado de purinas en mamíferos que bucean sea menos eficiente que el de mamíferos terrestres. Se sugiere que las actividades de las enzimas PNP y HGPRT pueden acoplarse de tal manera que, en eritrocitos de cerdo doméstico, un aumento en la actividad de PNP puede producir una mayor concentración de HX que es reutilizada por la HGPRT para regenerar IMP. En condiciones basales (en reposo), lo anterior puede implicar un menor gasto energético para el cerdo doméstico. En elefante marino del norte, a los ocho meses de edad, los individuos ya cuentan con una tasa metabólica, reservas de oxígeno (Hb y Mb) y capacidad de buceo similar a los adultos (Thornson y Le Boeuf, 1994; Le Boeuf *et al.*, 1996; Irvine *et al.*, 2000). Esto probablemente se refleje en la atenuación de algunas de las vías de síntesis, degradación y reciclado de purinas en mamíferos que bucean (elefante marino del norte) en condiciones basales (en reposo, sin buceo, sin apnea del sueño). Las apneas asociadas a los buceos y al sueño, así como el ayuno que experimentan después del destete y cuando salen a tierra, pueden influir en las actividades de algunas enzimas (XO y HGPRT) y la concentración de bases, nucleósidos y nucleótidos (HX, xantina, ATP) del metabolismo de purinas (Vázquez-Medina *et al.*, 2011; Soñanez-Organis *et al.*, 2012). Por lo tanto, se sugiere ampliar los estudios para incluir aspectos de la historia natural de las tres especies, como ayuno, muda, ejercicio y buceo.

9. CONCLUSIONES

Existen diferencias significativas entre especies en las actividades enzimáticas (XO y HGPRT) y la concentración de metabolitos y nucleótidos intracelulares (eritrocitos y músculo) y en circulación (plasma); estas diferencias, al parecer, son resultado de la capacidad fisiológica que presenta cada especie para tolerar procesos de hipoxia-isquemia, propios de su historia natural.

La actividad de IMPDH fue mayor en eritrocitos de cerdo doméstico y nutria neotropical en comparación con elefante marino del norte. Ello sugiere que, en los mamíferos terrestres y semiacuáticos, la vía de la síntesis *de novo* de guaninas es más activa en condiciones basales (en reposo), respecto a los mamíferos acuáticos.

La actividad de HGPRT fue mayor en cerdo doméstico en comparación con nutria neotropical y elefante marino del norte. Esto sugiere que el sistema de reciclado de purinas es más activo en mamíferos terrestres que en mamíferos acuáticos y semiacuáticos.

La actividad de HGPRT en conjunto con la actividad de XO y la concentración de HX en cerdo doméstico, sugiere que esta especie tiene capacidad para generar energía y, simultáneamente, evitar la producción de radicales libres.

La actividad de HGPRT en conjunto con la actividad de PNP en cerdo doméstico, sugieren la capacidad para regenerar energía a partir de bases preformadas producto del catabolismo de purinas.

Es probable que la actividad de HGPRT detectada en elefante marino del norte, sea un reflejo de sus reservas de oxígeno y capacidad de buceo, las cuales permiten una mejor utilización del oxígeno disponible durante los ciclos de buceos y apneas asociadas al sueño.

Es posible que el ácido úrico en plasma de elefante marino del norte y nutria neotropical contribuya a los mecanismos que permiten a los mamíferos acuáticos y semiacuáticos tolerar los eventos de hipoxia e isquemia resultado de las apneas del sueño y del buceo.

10. RECOMENDACIONES

Considerar los tiempos de colecta, conservación y análisis de las muestras, para evitar degradación de metabolitos y nucleótidos por congelación.

Ampliar el tamaño de muestra de nutria de río, e incluso analizar sangre de individuos silvestres, con la finalidad de explorar si existen diferencias metabólicas entre vida libre y cautiverio.

Analizar metabolitos de degradación, como HX, X, ácido úrico y alantoína; y las enzimas catabólicas que los utilizan como sustrato (HGPRT y XO), antes y después de apneas del buceo y del sueño, entre apneas y eupneas durante su estancia en tierra y durante buceos voluntarios, y entre crías después del destete y juveniles de ocho meses de edad.

Incluir el análisis de las enzimas adenosina deaminasa y AMP deaminasa (AMPD), encargadas de producir IMP e inosina, respectivamente.

Analizar la actividad de las enzimas adenilosuccinato sintetasa y adenilosuccinato liasa que limitan la síntesis *de novo* de los nucleótidos de adeninas.

Analizar la actividad de la enzima urato oxidasa que cataliza la conversión de ácido úrico a alantoína (producto final del catabolismo de purinas las tres especies analizadas).

11. LITERATURA CITADA

- Adam, T. 2005. Purine *de novo* Synthesis – Mechanisms and Clinical Implications. *Klin. Biochem. Metab.* 13 (3): 177-181.
- Alexiou, M., H.J. Leese. 1992. Purine utilisation, *de novo* synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos. *Development.* 114: 185-192.
- Álvarez-Lario, B., J. Macarrón-Vicente. 2010. Uric acid and evolution. *Rheumatology.* 49: 2010-2015.
- Álvarez-Romero, J., R.A. Medellín. 2005. *Sus scrofa* (doméstica). Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.
- Ames, B.N., R. Cathcart, E. Schwiers, P. Hochstein. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6858-6862.
- Balinsky, J.B. 1972. Phylogenetics Aspects of Purine Metabolism. *S. Afr. Med. J.* 46: 993-997.
- Bardot, V., A.M. Dutrillaux, J.Y. Delattre, F. Vega, M. Poisson, B. Dutrillaux, C. Luccioni. 1994. Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations. *Br. J. Cancer.* 70: 212-218.
- Bartholomew, G.A. 1954. Body temperature and respiratory and heart rates in the northern elephant seal. *Journal of Mammology.* 35: 211-218.
- Bello-Gutiérrez, J. 2008. Jamón Curado. Aspectos científicos y tecnológicos. Perspectiva de la Unión Europea. Ediciones Díaz de Santos. España. 629p.
- Benítez-Ortiz, W., M.D. Sánchez. 2001. Los cerdos locales en los sistemas tradicionales de producción. Estudio FAO. Producción y Sanidad Animal 148. 191p.
- Bertonatti, C., A. Parera. 1994. Lobito de río. Revista Vida Silvestre, Nuestro Libro Rojo, Fundación Vida Silvestre Argentina. Ficha No. 34, 2pp.
- Blackwell, S.B., B.J. Le Boeuf. 1993. Developmental aspects of sleep apnoea in northern elephant seals, *Mirounga angustirostris*. *J. Zool. Lond.* 231: 437-447.
- Bossart, G.D., T.H. Reidarson, L.A. Dierauf, D.A. Duffield. 2001. Clinical Pathology. En: Dierauf, L.A., F.M.D. Gulland (eds.). *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. CRC Press. Segunda edición. EUA. 1063p.

- Boutilier, R.G., J. St-Pierre. 2000. Surviving hypoxia without really dying. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 126: 481-490.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradley Poss, W., T.P. Huecksteadt, P.C. Panus, B.A. Freeman, J.R. Hoidal. 1996. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *Am. J. Physiol (Lung Cell. Mol. Physiol)*. 270 (14): 941-946.
- Brault, J.J., R.L. Terjung. 2001. Purine salvage to adenine nucleotides in different skeletal muscle fiber types. *J Appl Physiol*. 91: 231-238.
- Bryden, M.M., G.H.K. Lim. 1972. Blood parameters of the southern elephant seal (*Mirounga leonina*) in relation to diving. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 28: 139-148.
- Buchanan, J.M., S.C. Hartman. 1959. Enzymic reactions in the synthesis of the purines. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 21: 199-261.
- Burns, J.M., C.A. Clark, J.P. Richmond. 2004. The impact of lactation strategy on physiological development of juvenile marine mammals: implications for the transition to independent foraging. *International Congress Series 1275*. 341-350.
- Burns, J.M., D.P. Costa, K. Frost, J.T. Harvey. 2005. Development of body oxygen stores in harbor seals: Effects of age, mass and body composition. *Physiological and Biochemical Zoology*. 78(6): 1057-1068.
- Butler, P.J., D.R. Jones. 1997. Physiology of Diving of Birds and Mammals. *Physiological Reviews*. 77(3): 837-899.
- Bzowska, A., E. Kulikowska, D. Shugar. 2000. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*. 88: 349-425.
- Carver, J.D. 1999. Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Pædiatr Suppl* 430: 83-88.
- Castellini, M.A. 1986. Visualizing metabolic transitions in aquatic mammals: Does apnea plus swimming equal "diving"? *Canadian Journal of Zoology*. 66: 40-44.
- Castellini, M.A., D.P. Costa, A.C. Huntley. 1986. Hematocrit variation during sleep apnea in elephant seal pups. *American Journal of Physiology*. 251: 429-431.
- Castellini, M.A., R.W. Davis, G.L. Kooyman. 1988. Blood Chemistry Regulation during Repetitive Diving in Weddell Seals. *Physiological Zoology*. 61(5): 379-386.

Castellini, M.A., G.L. Kooyman, P.J. Ponganis. 1992a. Metabolic rates of freely diving Weddell seals: correlations with oxygen stores, swim velocity, and diving duration. *J. Exp. Biol.* 165: 181–94.

Castellini, M.A., R.W. Davis, G.L. Kooyman. 1992b. *Diving Behavior of the Weddell Seal: Annual Cycles*. University of California Press. Berkeley. USA. 28: 54p.

Castellini, J.M., M.A. Castellini. 1993. Estimation of Splenic Volume and Its Relationship to Long-Duration Apnea in Seals. *Physiological Zoology*. 66(4): 619-627.

Castellini, M.A. 1994. Apnea Tolerance in the Elephant Seal during Sleeping and Diving: Physiological Mechanisms and Correlations. En: Le Boeuf, B.J., R.M. (eds.). *Elephant Seals: Population, Ecology, Behavior and Physiology*. Laws. University of California Press. Berkeley. USA. 1-26.

Castellini, M.A., W.K. Milsom, R.J. Berger, D.P. Costa, D.R. Jones, J.M. Castellini, L.D. Rea, S. Sharma, M. Harris. 1994. Patterns of respiration and heart rate during wakefulness and sleep in elephant seal pups. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 266: 863-869.

Castellini, M.A., J.M. Castellini. 2004. Defining the limits of diving biochemistry in marine mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 139: 509-518.

Castellini, J.M., H.J. Meiselman, M.A. Castellini. 2006. Understanding and interpreting hematocrit measurements in pinnipeds. *Marine Mammal Science*. 12 (2): 251-264.

Čejková, J., T. Ardan, M. Filipec, A. Midelfart. 2002. Xanthine oxidoreductase and xanthine oxidase in human cornea. *Histol Histopathol.* 17: 755-760.

Chu, S.Y., P. Cashion, M. Jiang. 1989. A new colorimetric assay for purine nucleoside phosphorylase. *Clin Biochem.* 22: 357-362.

Cosgrove, M. 1998. Nucleotides. *Nutrition*. 14 (10): 748-751.

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.

Craig, S.P., A.E. Eakin. 2000. Purine Phosphoribosyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (27): 20231-20234.

Craik, J.D., J.D. Young, C. Cheeseman. 1997. Nucleoside transport in erythrocytes from bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117A (1): 127-134.

Duhm, J. 1974. Inosine permeability and nucleoside phosphorylase activity as limiting factors for the synthesis of 2,3-diphosphoglycerate from inosine, pyruvate, and inorganic phosphate in erythrocytes of various mammalian species. *Biochim. Biophys. Acta.* 343: 89-100.

Dunstone, N. 1998. Adaptations to the semi-aquatic habit and hábitat. En: Dunstone, N., M. Gorman (eds.). *Behavior and Ecology of Riparian Mammals*. Cambridge University Press. Cambridge Books Online. 391p.

Elder, A.L., G.G. Johnson. 1983. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in human erythroid cells: degradation of the enzyme. *Biochemical Genetics.* 21 (3/4): 227-238.

Elsner, R., S., S. Øyasæter, O. D. Saugstad, A.S. Blix. 1995. Seal adaptations for long dives: recent studies of ischemia and oxygen radicals. En: Blix, A., S.L. Walloe, O. Ultang (eds.). *Developments in Marine Biology. Vol. 4. Whales, Seals, Fish and Man. International Symposium on the Biology of Marine Mammals in the North East Atlantic. Tromso, Noruega, 1994.* Elsevier Science B.V. Amsterdam. 371-376.

Elsner, R., S. Øyasæter, R. Almaas, O. D. Saugstad. 1998. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A.* 119: 975-980.

Elsner, R. 1999. Living in Water: Solutions to Physiological Problems. En: Reynolds, J.E. III, S.A. Rommel. (eds.) *Biology of Marine Mammals*. Smithsonian Institution Press. Washington. USA. 73-116p.

Emmons, L.H. 1990. Neotropical rainforest mammals: a field guide. The University of Chicago Press. Chicago. 281p.

Engle, S.J., M.G. Stockelman, J. Chen, G. Boivin, M. Yum, P.M. Davies, M. Ying, A. Sahota, H.A. Simmonds, P.J. Stambrook, J.A. Tischfield. 1996. Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5307-5312.

Estes, J.A. 1989. Adaptations for aquatic living by carnivores. En: Gittleman, J.R (ed.). *Carnivore behavior, ecology and evolution*. Chapman & Hall, London and Cornell University Press. New York. 242-282.

Farnham, I.M., A.K. Singh, K.J. Stetzenbach, K.H. Johannesson. 2002. Treatment of nondetects in multivariate analysis of groundwater geochemistry data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 60: 265-281.

Fernández-Morán, J., L. Molina, G. Flamme, D. Saavedra, X. Manteca-Villanova. 2001. Hematological and biochemical reference intervals for wild caught eurasian otters from Spain. *Journal of Wildlife Diseases.* 37 (1): 159-163.

- Fish, F.E. 1993. Influence of hydrodynamic design and propulsive mode on mammalian swimming energetics. *Aust. J. Zool.* 42: 79-101.
- Fish, F.E., R.V. Baudinette. 1999. Energetics of locomotion by the Australian water rat (*Hydromys chrysogaster*): comparison of swimming and running in a semiaquatic mammal. *J Exp Biol.* 202: 353–363.
- Fish, F.E. 2000. Biomechanics and Energetics in Aquatic and Semiaquatic Mammals: Platypus to Whale. *Physiological and Biochemical Zoology.* 73 (6): 683-698.
- Folkow, L.P., A.S. Blix. 1999. Diving behavior of hooded seals (*Cystophora cristata*) in the Greenland and Norwegian Seas. *Polar Biol.* 22: 61-74.
- Fujise, Y., H. Hidaka, R. Tatsukawa, N. Miyazaki. 1985. External measurements and organ weights of five Weddell seals (*Leptonychotes weddelli*) caught near Syowa Station. *Jpn. Fisheries Bull.* 85: 96-99.
- Gad, S.C. 2007. *Animal models in toxicology.* Taylor & Francis. London. 932p.
- Gallo-Reynoso, J.P. 1997. Situación y distribución de las nutrias en México, con énfasis en *Lontra longicaudis annectens* Major, 1897. *Revista Mexicana de Mastozoología.* 2: 10-32.
- Gallo-Reynoso, J.P. 2008. Nutría de río: la especie que comparte nuestra historia. *Especies.* 8-13.
- Gallo-Reynoso, J.P., E.M. Hoyos-Padilla. 2011. Elefante marino: dueño de las playas. *Especies. Revista sobre conservación y biodiversidad.* 18-23.
- Gianattasio, S., S. Gagliardi, M. Samaja, E. Marra. 2003. Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and β -nicotinamide adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. *Brain Research Protocols.* 10: 168-174.
- Glander, P., K.P. Braun, P. Hambach, S. Bauer, I. Mai, I. Roots, J. Waiser, L. Fritsche, H. Neumayer, K. Budde. 2001. Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clinical Biochemistry.* 34: 543-549.
- Grum, C.M., R.H. Simon, D.R. Dantzker, I.H. Fox. 1985. Evidence of Adenosine Triphosphate Degradation in Critically-ill Patients. *CHEST.* 88 (5): 763-767.
- Harrington, L.A., G.C. Hays, L. Fasola, A.L. Harrington, D. Righton, D.W. Macdonald. 2012. Dive performance in a small-bodied, semi-aquatic mammal in the wild. *Journal of Mammology.* 93 (1): 198-210.

- Harrison, R. 2002. Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where are we now?. *Free Radical Biology & Medicine*. 33 (6): 774-797.
- Hedrick, M.S., D.A. Duffield, L.H. Cornell. 1986. Blood viscosity and optimal hematocrit in a deep-diving mammal, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Can. J. Zool.* 64: 2081-2085.
- Hedstrom, L. 2009. IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism and Inhibition. *Chem Rev.* 109 (7): 2903-2928.
- Hellsten, Y., U. Frandsen, N. Østhenblad, B. Sjødin, E.A. Richter. 1997. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *Journal of Physiology*. 498 (1): 239-248.
- Hellsten, Y., E.A. Richter, B. Kiens, J. Bangsbo. 1999. AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol (Lond)*. 520: 909-920.
- Hindell, M.A., D.J. Slip, H.R. Burton, M.M. Bryden. 1991. Physiological implications of continuous, prolonged, and deep dives of southern elephant seals. *Can. J. Zool.* 70: 370-379.
- Hindell, M.A., M.A. Lea, M.G. Morrice, C.R. MacMahon. 2000. Metabolic limits on dive duration and swimming speed in the southern elephant seal *Mirounga leonina*. *Physiological and Biochemical Zoology*. 73 (6): 790-798.
- Hochachka, P.W., G.N. Somero. 2002. Biochemical adaptation – Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press. New York. USA. 466p.
- Hoelzel, A.R. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal. *Biological Journal of the Linnean Society*. 68: 23-39.
- Huntley, A.C. 1984. Relationships between metabolism, respiration, heart rate, and arousal states in the northern elephant seal. Ph.D. dissertation. University of California. Santa Cruz. USA.
- Irvine, L.G., M.A. Hindell, J. van den Hoff, H.R. Burton. 2000. The influence of body size on dive duration of underyearling southern elephant seals (*Mirounga leonina*). *J. Zool. Lond.* 251: 463-471.
- Iversen, M., J. Aars, T. Haug, I.G. Alsos, C. Lydersen, L. Bachmann, K.M. Kovacs. 2013. The diet of polar bears (*Ursus maritimus*) from Svalbard, Norway, inferred from scat analysis. *Polar Biol.* 36: 561-571.

Jacobsen, L.O., E. Goldwasser, W. Fried, L.F. Plzak. 1957. Studies on erythropoiesis. VII. The role of the kidney in the production of erythropoietin. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 70: 305.

Janssen, M. 1993. Purines, free radicals and antioxidant systems – A study in hearts of various species, including humans. Netherlands. 163p.

Jarvis, S.M., J.D. Young, M. Ansay, A.L. Archibald, R.A. Harkness, R.J. Simmonds. 1980. Is inosine the physiological energy source of pig erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes.* 597 (1): 183-188.

Jimenez, C., B. Melin, N. Koulmann, A.M. Allevard, J.C. Launay, G. Savourey. 1999. Plasma volumen changes during and after acute variations of body hydration level in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 80: 1-8.

Judge, A.R., S.L. Dodd. 2004. Xanthine oxidase and activated neutrophils cause oxidative damage to skeletal muscle after contractile claudication. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286: 252-256.

Keebaugh, A.C. 2009. Evolution of purine metabolism. Doctor of Philosophy Dissertation. Graduate Division of Biological and Biomedical Sciences. Emory University. Atlanta, Georgia. USA. 161p.

Kelly, B.P., D. Watzok. 1996. Ringed seal diving behavior in the breeding season. *Canadian Journal of Zoology.* 74: 1547-1555.

Kenyon, K. 1969. The sea otter in the Eastern Pacific Ocean. US Bureau of Sports Fisheries and Wildlife. Washington, DC. Vol. 68.

Khalpey, Z., A.H.Y. Yuen, M. Lavitrano, C.G.A. McGregor, K.K. Kalsi, M.H. Yacoub, R.T. Smolenski. 2007. *Mol Cell Biochem.* 304: 109-117.

Kimber, K., G.V. Kollias II. 2005. Evaluation of Injury Severity and Hematologic and Plasma Biochemistry Values for Recently Captured North American River Otters (*Lontra canadensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 36 (3): 371-384.

Kodama, A.M., R. Elsner, N. Pace. 1977. Effects of growth, diving history, and high altitude on blood oxygen capacity in harbor seals. *Journal of Applied Physiology.* 42: 852-858.

Kooij, A., H.J. Schiller, M. Schijns, C.J.F. Van Noorden, W. Frederiks. 1994. Conversion of xanthine deshydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia. *Hepatology.* 19: 1488-1495.

- Kooyman, G.L., E.A. Wahrenbrock, M.A. Castellini, R.W. Davis, E.E. Sinnett. 1980. Aerobic and Anaerobic Metabolism During Voluntary Diving in Weddell Seals: Evidence of Preferred Pathways from Blood Chemistry and Behavior. *J. Comp. Physiol.* 138: 335-346.
- Kooyman, G.L. 1989. Diverse Divers: Physiology and Behavior. En: Johansen, K., D.S. Farner. (eds). *Zoophysiology Series*. Springer-Verlag. 216p.
- Kooyman, G.L., P.J. Ponganis. 1998. The Physiological Basis of Diving to Depth: Birds and Mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 19-32.
- Kooyman, G.L. 2002. Diving Physiology. En: Perrin, W.F., B. Würsig, J.G.M. Thewissen. (eds.) *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. California. USA. 1414p.
- Kruuk, H. 1995. *Wild otters: Predation and Populations*. Oxford University Press. USA. 290p.
- Le Boeuf, B.J., R.J. Whiting, R.F. Gantt. 1972. Perinatal Behavior of Northern Elephant Seal Females and Their Young. *Behaviour*. 43 (1-4): 121-156.
- Le Boeuf, B.J., D.E. Crocker, S.B. Blackwell, P.A. Morris, P.H. Thorson. 1993. Sex differences in diving and foraging behaviour of northern elephant seals. *Symposia of the Zoological Society of London*. 66: 149-178.
- Le Boeuf, B.J., R.M. Laws. 1994. Elephant Seals: An Introduction to the Genus. En: Le Boeuf, B.J., R.M. (eds.). *Elephant Seals: Population, Ecology, Behavior and Physiology*. Laws. University of California Press. Berkeley. USA. 1-26.
- Le Boeuf, B.J., P.A. Morris, S.B. Blackwell, D.E. Crocker, D.P. Costa. 1996. Diving behavior of juvenile northern elephant seals. *Can. J. Zool.* 74: 1632-1644.
- Leffler, C.W., D.W. Busija, R. Mirro. 1989. Effects of ischemia on brain blood flow and oxygen consumption of newborn pigs. *Am J Physiol.* 257: 1917-1926.
- López-Cruz, R.I., M. Barjau Pérez-Milicua, D.E. Crocker, R. Gaxiola-Robles, J.A. Bernal-Vertiz, A. de la Rosa, J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín. 2014. Purine nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase activities in erythrocytes and plasma from marine, semiaquatic and terrestrial mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 171: 31-35.
- MacArthur, R.A. 1989. Aquatic Mammals in Cold. En: Wang, C.H. (eds.). *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Volume 4. Springer-Verlag. Berlin. 441p.
- Marmi, J., J.F. López-Giráldez, X. Domingo-Roura. 2004. Phylogeny, evolutionary history and taxonomy base don sequences of the cytochrome *b* gene and a complex repetitive flanking región. *Zoologica Scripta*. 33 (6): 481-499.

- Mason, C.F., S.M. Macdonald. 2008. Otters: Ecology and Conservation. Cambridge University Press. USA. 156p.
- McIntyre, T., P.J.N. de Bruyn, I.J. Ansorge, M.N. Bester, H. Bornemann, J. Plötz, C.A. Tosh. 2010. A lifetime at depth: vertical distribution of southern elephant seals in the water column. *Polar Biol.* 33: 1037-1048.
- Miller, E.R., D.E. Ullrey, I. Ackermann, D.A. Schmidt, R.W. Luecke, J.A. Hofer. 1961. Swine Hematology from Birth to Maturity. II. Erythrocyte Population, Size and Hemoglobin Concentration. *J. Anim. Sci.* 20: 890-897.
- Miller, N.J., A.D. Postle, S Orgeig, G. Koster, C.B. Daniels. 2006. The composition of pulmonary surfactant from diving mammals. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 152: 152-168.
- Moffatt, B.A., H. Ashihara. 2002. Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism. *Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. 20p.
- Montero, C., J.A. Duley, L.D. Fairbanks, M.B. McBride, V. Micheli, A.J. Cant, G. Morgan. 1995. Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clinica Chimica Acta.* 238: 169-178.
- Moriwaki, Y., T. Yamamoto, K. Higashino. 1999. Enzymes involved in purine metabolism – A review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol.* 14: 1321-1340.
- Mortensen, J.T., P. Brinck, J. Lichtenberg. 1998. The minipig in dermal toxicology. A literatura review. *Scand J Lab Anim Sci.* 25: 77-83.
- Murray, A.W. 1971. The Biological Significance of Purine Salvage. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 811-826.
- Nolet, B.A., D.E.H. Wansink, H. Kruuk. 1993. Diving of otters (*Lutra lutra*) in a marine habitat: use of depths by a single-preyloader. *Journal of Animal Ecology.* 62: 22-32.
- Nyhan, W.L. 2005. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism.* 86: 25-33.
- O'Brien, F.E., O. Iwata, J.S. Thornton, E. De Vita, M.W. Sellwood, S. Iwata, Y.S. Sakata, S. Charman, R. Ordidge, E.B. Cady, J.S. Wyatt, N.J. Robertson. 2006. Delayed whole-body cooling to 33 or 35 degrees C and the development of impaired energy generation consequential to transient cerebral hypoxia-ischemia in the newborn piglet. *Pediatrics.* 117: 1549-1559.

- Odden, J.P., T. Stiris, T.W. Hansen, D. Bratlid. 1989. Cerebral blood flow during experimental hypoxaemia and ischaemia in the newborn piglet. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 360: 13-19.
- Ortíz, R.M., D.P. Noren, C.L. Ortiz, F. Talamantes. 2003. GH and ghrelin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Miroungaangustirostris*). *Journal of Endocrinology.* 178: 533-539.
- Panneton, W.M. 2013. The Mammalian Diving Response: An Enigmatic Reflex to Preserve Life? *PHYSIOLOGY.* 28: 284-297.
- Pang, B., J.L. McFaline, N.E. Burgis, M. Dong, K. Taghizadeh, M.R. Sullivan, C.E. Elmquist, R.P. Cunningham, P.C. Dedon. 2012. Defects in purine nucleotide metabolism lead to substantial incorporation of xanthine and hypoxanthine into DNA and RNA. *PNAS.* 109 (7): 2319-2324.
- Parera, A. 1996. Las nutrias verdaderas de la Argentina. *Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.* 38p.
- Persson, S.G.B., L. Ekman, G. Lydin, G. Tufvesson. 1973. Circulatory effects of splenectomy in the horse. I. Effect on red-cell distribution and variability of haematocrit in the peripheral blood. *Zbl. Vet. Med. A.* 20: 441-455.
- Ponganis, P.J., G.L. Kooyman, D. Sartorius, P. Jobsis. 1992. Pinniped splenic volume. *Am. J. Physiol. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 262: 322-325.
- Ponganis, P.J. J.U. Meir, C.L. Williams. 2011. In pursuit of Irving and Scholander: a review of oxygen store management in seals and penguins. *The Journal of Experimental Biology.* 214: 3325-3339.
- Proctor, P.H., 2008. Uric acid and neuroprotection. *Stroke.* 39:126.
- Ramsay, M.A., K.A. Hobson. 1991. Polar bears make little use of terrestrial food webs: evidence from stable-carbon isotope analysis. *Oecologia.* 86: 598-600.
- Redford, K.H., J.F. Eisenberg. 1992. *Mammals of the Neotropics: the Southern Cone. Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay.* The University of Chicago Press. Chicago. 2: 430p.
- Reeves, R.R., B.S. Stewart, S. Leatherwood. 1992. *The Sierra Club Handbook of Seals and Sirenians. Part II: Pinnipeds-Northern Elephant Seal.* 227-234.
- Reidarson, T.H., D. Duffield, J. McBain. 2000. Normal hematology of marine mammals. En: Feldman, B.F., J.G. Zinkl, N.C. Jain. (eds.). *Schalm's Veterinary Hematology.* Lippincott Williams & Wilkins. Quinta edición. Philadelphia, EUA. 1164-1173.

- Roberts, E.L.L., R.P. Newton, A.T. Axford. 2004. Plasma purine nucleoside phosphorylase in cancer patients. *Clinica Chimica Acta*. 334: 109-114.
- Sandberg, A.A., G.R. Lee, G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe. 1955. Purine nucleoside phosphorylase activity of blood. 1 Erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 34: 1823-1829.
- Schagatay, E., J.P. Andersson, B. Nielsen. 2007. Hematological response and diving response during apnea and apnea with face immersion. *Eur. J. Appl. Physiol.* 101: 125-132.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*. Cambridge University Press. Fifth Edition. United Kingdom. 617p.
- Schopf, G., M. Havel, R. Fasol, M.M. Müller. 1986. Enzyme activities of purine catabolism and salvage in human muscle tissue. *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man V. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 131: 507-509.
- Schreer, J.F., K.M. Kovacs. 1997. Allometry of diving capacity in air-breathing vertebrates. *Can. J. Zool.* 75: 339-358.
- Simpson, J.G., W.G. Gilmartin, S.H. Ridgway. 1970. Blood volumen and other hematologic values in young elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Am. J. Vet. Res.* 31: 1449-1452.
- Sintchak, M.D., E. Nimmesgern. 2000. Th estructure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology*. 47: 163-184.
- Smolenski, R.T., Z. Khalpey, A. Yuen, H. Dziewit, E.M. Slominska, T. Borkowski, M. Zdunek, Z. Kochan, J. Karbowska, M. Lavitrano, M.H. Yacoub. 2005. Purine Metabolism in Pigs and Humans and Its Implications for Xenotransplantation. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 24 (4): 263-266.
- Sonoda, T., M. Tatibana. 1978. Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acid ingested by mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 521 (1): 55-66.
- Soñanez-Organis, J.G., J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín, A. Aguilar, D.E. Crocker, R.M. Ortiz. 2012. Prolonged fasting increases purine recycling in post-weaned northern elephant seals. *The Journal of Experimental Biology*. 215: 1448-1455.
- Stathis, C.G., S. Zhao, M.F. Carey, R.J. Snow. 1999. Influence of sprint training on human skeletal muscle purine nucleotide metabolism. *J Appl Physiol*. 76: 1802-1809.
- Stewart, B.S., R.L. DeLong. 1994. Postbreeding foraging migrations of northern elephant seals. En: Le Boeuf, B.J., R.M. (eds.). *Elephant Seals: Population, Ecology, Behavior and Physiology*. Laws. University of California Press. Berkeley. USA. 290–309.

- Stewart, B.S., R.L. DeLong. 1995. Double Migrations of the Northern Elephant Seal, *Mirounga angustirostris*. *Journal of Mammology*. 76 (1): 196-205.
- Stockard, T.K., D.H. Levenson, L. Berg, J.R. Fransioli, E.A. Baranov, P.J. Ponganis. 2007. Blood oxygen depletion during rest-associated apneas of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *The Journal of Experimental Biology*. 210: 2607-2617.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29: 1715-1733.
- Stout, J.T., C.T. Caskey. 1985. HPRT: Gene structure, expression, and mutation. *Ann. Rev. Genet.* 19: 127-148.
- Swindle, M.M., A. C. Smith. 1998. Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand. J. Lab. Anim. Sci. Suppl.* 25: 11-21.
- Tax, W.J.M., J.H. Veerkamp, J.M.F. Trijbels. 1976. Activity of purine phosphoribosyltransferases and two enzymes of pyrimidine biosynthesis in erythrocytes of ten mammalian species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 54(2): 209-212.
- Thornson, P.H. 1993. Development of diving in northern elephant seal. PhD thesis University of California Santa Cruz. California. 210p.
- Thornson, P.H., B.J. Le Boeuf. 1994. Developmental aspects of diving in northern elephant seal pups. En: Le Boeuf, B.J., R.M. Laws. (eds.). *Elephant seals: Population Ecology, Behavior and Physiology*. University of California Press. Berkeley, CA. 271-289.
- Thornton, S.J., D.M. Spielman, N.J. Pelc, W.F. Block, D.E. Crocker, D.P. Costa, B.J. LeBoeuf, P.W. Hochachka. 2001. Effects of forced diving on the spleen and hepatic sinus in northern elephant seal pups. *PNAS*. 98 (16): 9413-9418.
- Thornton, S.J., P.W. Hochachka. 2004. Oxygen and the diving seal. *Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc.* 31 (1): 81-95.
- Traut, T.W. 1994. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 140: 1-22.
- Van Der Weyden, M.B., W.N. Kelly. 1974. Human Adenylsuccinate Synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*. 249 (22): 7282-7289.
- Van Eijk, H.G., G. De Jong. 1992. The Physiology of Iron, Transferrin and Ferritin. *Biological Trace element Research*. 35: 13-24.

Vázquez-Medina, J.P., T. Zenteno-Savín, R. Elsner. 2006. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: Potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 142: 198-204.

Vázquez-Medina, J.P., T. Zenteno-Savín, M.S. Tift, H.J. Forman, D.E. Crocker, R.M. Ortíz. 2011. Apnea stimulates the adaptive response to oxidative stress in elephant seal pups. *The Journal of Experimental Biology*. 214: 4193-4200.

Waldenström, A., M. Haney, B. Biber, M. Kavianipour, T. Moritz, P. Strandén, G. Wikström, G. Ronquist. 2010. Ischaemic preconditioning is related to decreasing levels of extracellular adenosine that may be metabolically useful in the at-risk myocardium: an experimental study in the pig. *Acta Physiol*. 199: 1-9.

Weber, D.S., B.S. Stewart, J. Schienman, N. Lehman. 2004. Major histocompatibility complex variation at three class II loci in the northern elephant seal. *Molecular Ecology*. 13: 711-718.

Werner, A. K., C. Witte. 2011. The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends in Plant Science*. 16 (7): 381-387.

Wilhelm Filho, D., F. Sell, L. Ribeiro, M. Ghislandi, F. Carrasquedo, C.G. Fraga, J.P. Wallauer, P.C. Simões-Lopes, M.M. Uhart. 2002. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 133: 885-892.

Williams, T.D., L.T. Pulley. 1983. Hematology and blood chemistry in the sea otter (*Enhydra lutris*). *Journal of Wildlife Diseases*. 19 (1): 44-47.

Williams, T. 2001. Intermittent Swimming by Mammals: A Strategy for Increasing Energetic Efficiency During Diving. *Amer. Zool*. 41: 166-176.

Worthy, G.A.J., P.A. Morris, D.P. Costa, B.J. Le Boeuf. 1992. Moulting energetics of northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *J. Zool. Lond.* 227: 257-265.

Yamamoto, T., Y. Moriwaki, S. Takahashi, Y. Nasako, J. Yamakita, K. Hiroishi, K. Higashino. 1995. Determination of plasma purine nucleoside phosphorylase activity by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 227: 135-139.

Yochem, P.K., B.S. Stewart, J.A.K. Mazet, W.M. Boyce. 2008. Hematologic and serum biochemical profile of the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*): variation with age, sex, and season. *Journal of Wildlife Diseases*. 44 (4): 911-921.

Yuen, A.H.Y., Z. Khalpey, M. Lavitrano, C.G.A. McGregor, K.K. Kalsi, M.H. Yacoub, R.T. Smolenski. 2006. Differences in Activities of the Enzymes Of Nucleotide Metabolism and its Implications for Cardiac Xenotransplantation. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 25 (9-11): 1221-1224.

- Zapol, W.M. 1987. Diving adaptations of the Weddell Seal. *Sci Am.* 256: 100-105.
- Zapol, W.M., R.D. Hill, J. Qvist, K. Falke, R.C. Schneider, G.C. Liggins, P.W. Hochachka. 1989. Arterial gas tensions and hemoglobin concentrations of the freely diving Weddell seal. *Undersea Biomedical Res.* 16 (5): 363-373.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. New Jersey. USA. 123p.
- Zenteno-Savín, T., E. Clayton-Hernández, R. Elsner. 2002. Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 133: 527-536.
- Zhang, Y., M. Morar, S.E. Ealick. 2008. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3699-3724.
- Zimmermann, A.G., J-J. Gu, J. Laiberté, B.S. Mitchell. 1998. Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase: Regulation of expression and role in cellular proliferation and T Lymphocyte activation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 61: 181-209.

12. ANEXO

Primera publicación de resultados:

López-Cruz, R.I., M. Barjau Pérez-Milicua, D.E. Crocker, R. Gaxiola-Robles, J.A. Bernal-Vertiz, A. de la Rosa, J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín. 2014. Purine nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase activities in erythrocytes and plasma from marine, semiaquatic and terrestrial mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 171: 31-35.