

Tesis de Posgrado

Niveles de antioxidantes en peces Antárticos pertenecientes a las familias nototheniidae y channichthyidae

Ansaldo, Martín

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ansaldo, Martín. (2001). Niveles de antioxidantes en peces Antárticos pertenecientes a las familias nototheniidae y channichthyidae. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3355_Ansaldo.pdf

Cita tipo Chicago:

Ansaldo, Martín. "Niveles de antioxidantes en peces Antárticos pertenecientes a las familias nototheniidae y channichthyidae". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3355_Ansaldo.pdf

Universidad de Buenos Aires

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas**

**NIVELES DE ANTIOXIDANTES EN PECES ANTÁRTICOS
PERTENECIENTES A LAS FAMILIAS NOTOTHENIIDAE
Y CHANNICHTHYIDAE**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas**



Autor: Martín Ansaldo

Directora: Dra. Susana Llesuy

2001

Nº 3355

"La vida es el susto de un sueño".



**Macedonio Fernández
(Cuadernos de Todo y Nada)**

A la Dra. Susana Llesuy, por transmitirme sus conocimientos bioquímicos y por brindarme la libertad necesaria para desarrollar mi trabajo.

Al Dr. Carlos Marcelo Luquet, por su "codirección fisiológica ad honorem", su amistad y su consejo.

Al Dr. Enrique Marschoff, mi jefe antártico, porque gracias a su apoyo incondicional y a su "inconciencia" comencé a desarrollar el presente trabajo de tesis.

A Griselda Genovese y Gabriel "Colo" Rosa, por su amistad y su asesoramiento en la realización de las técnicas histológicas y las fotos que figuran en esta tesis.

A Marisa Repetto, Sandra Ferreira, Charito Díaz, Marina Travacio, Pablo Evelson y José María Polo por los años compartidos en el laboratorio de la Cátedra de Química General e Inorgánica (Farmacia y Bioquímica).

A Daniel "Peluche" Nahabedian, Javier "Hormiga" Calcagno y Carlos "Miskua" Bertrán por compartir la campaña de pesca en el BIP E. Holmberg, soportar mis nauseas.... y mi "color verde".

A Santiago "Esloveno" Kocmur, Guillermo "Willy" Visbeek, Sergio "Tancredo" Mendes Garrido, Silvia "La melli" Rodriguez, Silvia "La muda" Buján, Guillermo "Willy" Mercuri, mis secuaces antárticos.

A Inés y Eugenia, de la Tesorería de la Dirección Nacional del Antártico, por ser siempre atentas y consideradas con mis pedidos de compras.

A Julia, Pupi, Matías, Martín Tres, Analía, Carolina y Luciana, mis compañeros carcinólogos.

A Luisa Fiorito y Lilia Lauría por su asesoramiento en la interpretación histológica de las fotos.

A Gladicita y el Chango, mis compañeros del Laboratorio de Histología Animal.

A Irene, mi vieja, a Leo, mi tía y a Conce, mi abuela, por su amor y apoyo constante e incondicional.

A la memoria de Arturo, mi viejo, y de Atilio, "*El pato de San Fernando*".

A Lila, Clara, Carolina, Rogelio, Pucho y Pascual, por ser mi conexión directa con la naturaleza.

Por miles de años, los peces antárticos han estado aislados en un ambiente con temperaturas muy bajas (con poca fluctuación estacional) y con un alto contenido de oxígeno. En tales condiciones, el estrés oxidativo pudo ser uno de los factores más importantes que afectaron sus estrategias adaptativas metabólicas. Se tomaron muestras de tejidos de especies pertenecientes a dos familias de peces antárticos Nototheniidae (nototénidos) y Channichthyidae (caníctidos o peces de hielo). En homogenatos de hígado, branquias, corazón y músculo, fue medida la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); los niveles de vitamina E y la capacidad antioxidante total (TRAP). También se analizó la actividad de SOD en muestras de sangre.

La actividad de SOD branquial es 3 veces mayor en caníctidos comparada con la de los nototénidos, mientras que la actividad de CAT y GPx es significativamente mas alta en las branquias de los nototénidos. El aumento de la actividad de SOD branquial podría ser reflejo del importante gradiente de PO_2 que ocurre a través del epitelio branquial de los caníctidos. La baja actividad de CAT y GPx hallada en las branquias de estas especies sugeriría que la H_2O_2 producida sería eliminada preferentemente por difusión. Por el contrario, la actividad de SOD sanguínea es 5 veces más alta en los nototénidos, los cuales poseen eritrocitos en sangre que aumentan la capacidad de transporte de oxígeno. En estos peces, la actividad de CAT es más alta en todos los tejidos estudiados excepto en músculo.

Comparando los niveles de vitamina E entre ambas familias no se observan claras diferencias salvo para aquellos valores que corresponden a músculo. El alto contenido de vitamina E medido podría estar correlacionado con la alta densidad del volumen de mitocondrias por volumen de fibra muscular de los caníctidos, dado que la vitamina E es responsable de la protección de los lípidos de membrana frente a su peroxidación. De manera coincidente el valor de TRAP (que representa la capacidad antioxidante total asociada a moléculas hidrosolubles) es también alto en el músculo de los caníctidos. Esto está probablemente relacionado con la función del ácido ascórbico (un compuesto hidrosoluble), que regenera la capacidad antioxidante de la vitamina E.

La característica más saliente del epitelio que recubre las laminillas secundarias en las branquias de los peces de hielo es su borde externo ondeado, característica ausente en el epitelio branquial de los nototénidos.

Los valores de las distancias de difusión sangre-agua, medidas en las branquias de las especies de los peces estudiados, se correlacionan positivamente con el hábito descrito para cada especie, sin importar a que familia pertenecen.

Palabras clave: enzimas antioxidantes, antioxidantes no enzimáticos, peces antárticos, Perciformes, Nototheniidae, Channichthyidae.

B

Antarctic fishes have been isolated for over several million years in an environment with very low and constant temperature and high oxygen concentration. In such conditions the oxidative stress might have been an important factor affecting their metabolic adaptive strategies. Activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), vitamin E levels and total antioxidant capacity (TRAP) were measured on liver, gill, heart and muscle homogenates of red-blooded (Nototheniidae) and white-blooded (Channichthyidae) Antarctic fishes. SOD activity was also measured in blood samples.

Gill SOD activity was 3-fold higher in channichthyids than in nototheniids while CAT and GPx were significantly higher in the gills of nototheniids. The increased SOD activity of channichthyids probably reflects the large PO₂ gradient across their gills. The H₂O₂ produced seems to be preferentially eliminated by diffusion according to the low levels of CAT and GPx found in the gills of these species. On the contrary blood SOD was about 5-fold higher in the nototheniids, which possesses erythrocytes and thus a much higher oxygen carrying capacity. CAT activity was always higher in nototheniids except in muscle.

On the other hand, vitamin E did not show clear differences between families excepting for the pattern observed in muscle. The higher content of vitamin E in this tissue shown by channichthyids is related to the higher volume density of mitochondria reported for this group, since vitamin E is responsible for avoiding membrane lipid peroxidation. Accordingly, TRAP (representative of hydrosoluble antioxidant capacity) was also higher in muscle of channichthyids. This is probably related to the role of the ascorbic acid (a hydrosoluble compound) in regenerating vitamin E.

In icefish, the epithelium of the gill secondary lamellae shows a wavy appearance, this characteristic is absent in nototheniids.

The diffusion distances of the gills of the studied fish showed a marked relationship with the fish's ecotypes regardless the family they belong to.

Key Words: antioxidant enzymes, non-enzymatic antioxidants, Antarctic fish, Perciforms, Nototheniidae, Channichthyidae.

Agradecimientos

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 3 |
| Índice | 5 |
| Introducción | |
| La toxicidad del oxígeno | 9 |
| Definición de radicales libres | 10 |
| <i>Especies activas del oxígeno (EAO)</i> | 11 |
| Generación de especies activas del oxígeno | 13 |
| Fuentes de anión superóxido | 13 |
| Fuentes de peróxido de hidrógeno | 14 |
| Estrés oxidativo | 15 |
| Reacciones en cadena iniciadas por intermediarios de la reducción del oxígeno | 16 |
| Peroxidación de lípidos | 16 |
| Iniciación | 17 |
| Propagación | 18 |
| Terminación | 19 |
| Consecuencias de la peroxidación de lípidos | 20 |
| Sistemas de defensa antioxidante | 20 |
| Defensas antioxidantes enzimáticas | 20 |
| Superóxido dismutasa (SOD) | 20 |
| Catalasa (CAT) | 21 |
| Glutación peroxidasa (GPx) | 22 |
| Sistemas antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles | 23 |
| Glutación (GSH) | 23 |
| Ácido ascórbico | 24 |

| | |
|---|-----------|
| Ácido úrico | 25 |
| Sistemas antioxidantes no enzimáticos liposolubles | 26 |
| Coenzima Q (ubiquinona) | 26 |
| Carotenoides | 26 |
| Vitamina E | 27 |
| El océano Austral | 30 |
| Anexo 1 | 34 |
| Origen del Suborden Notothenioidei | 34 |
| Taxonomía | 36 |
| Descripción de las familias analizadas según Fisher W. y Hureau J.C. (1985) | 37 |
| Familia Nototheniidae | 37 |
| Familia Channichthyidae | 38 |
| Clasificación taxonómica de los animales analizados en el presente trabajo (Eastman, 1993) | 39 |
| Anexo 2 | 42 |
| Características físicas de las islas Georgias del Sur | 42 |
| Hipótesis | 43 |
| Objetivos | 44 |
| Materiales y métodos | |
| Colección de los especímenes y toma de muestras | 45 |
| Colección de muestras para microscopía óptica | 46 |
| Preparación de los homogenatos tisulares | 46 |
| Preparación de los extractos eritrocitarios | 47 |
| Determinaciones enzimáticas | 48 |
| Actividad de superóxido dismutasa | 48 |
| Actividad de catalasa | 50 |
| Actividad de glutatión peroxidasa | 51 |

| | |
|---|----|
| Capacidad antioxidante total (TRAP) | 53 |
| Fundamento | 53 |
| Método de medición | 55 |
| Determinación de la concentración de proteínas | 56 |
| Determinación del contenido de antioxidantes liposolubles | 56 |
| Preparación de los extractos para HPLC | 56 |
| Características del equipo de HPLC y condiciones de trabajo | 57 |
| Preparaciones histológicas | 57 |
| Resultados de la tinción | 58 |
| Cálculo de las distancias de difusión | 58 |
| Métodos estadísticos | 58 |
| Resultados | |
| 1) Actividad de las enzimas antioxidantes | 60 |
| Superóxido dismutasa (SOD) | 60 |
| Catalasa (CAT) | 62 |
| Glutación peroxidasa (GPx) | 63 |
| 2) Niveles de vitamina E | 64 |
| 3) Capacidad Antioxidante Total (TRAP) | 65 |
| 4) Análisis de la anatomía e histología branquial de las especies estudiadas | 67 |
| Anatomía | 67 |
| Histología | 68 |
| 5) Distancias de difusión | 69 |
| Discusión | 76 |
| Defensas antioxidantes en peces antárticos | 80 |
| Estructura y morfometría branquial | 87 |
| Conclusiones | 90 |

INTRODUCCIÓN

La toxicidad del oxígeno

Inicialmente, la atmósfera terrestre carecía de oxígeno. Los primeros organismos vivientes fueron anaerobios y tenían a la luz como única fuente de energía para la subsistencia. Sin embargo, la fotólisis del agua dio lugar a la generación del oxígeno, el cual gradualmente fue alcanzando su proporción actual en la atmósfera terrestre. Este hecho facilitó primero la aparición de organismos aeróbicos unicelulares, de naturaleza relativamente simple, y luego especies pluricelulares más complejas que utilizaban el oxígeno molecular en los procesos de obtención de energía.

El advenimiento de la vida aeróbica significó una gran ventaja desde el punto de vista evolutivo, ya que permitió el uso del oxígeno como oxidante terminal para la combustión de los nutrientes orgánicos y, al mismo tiempo, la restitución de dióxido de carbono y agua, que son consumidos por organismos fotosintéticos.

Desde entonces ha predominado la forma de respiración que requiere oxígeno, mucho más eficiente para la obtención de energía que la forma anaeróbica. Sin embargo, a pesar de que el oxígeno es un requerimiento esencial para la vida, los seres vivos son sensibles a los efectos dañinos que provocan concentraciones de este gas mayores a las presentes normalmente en el aire.

El fenómeno de la toxicidad del oxígeno fue descrito en forma casi paralela a su descubrimiento como componente químico del aire. Lavoisier mostró experimentalmente el efecto tóxico de altas presiones de oxígeno en el pulmón de distintos animales, mientras que Priestley remarcó el peligro de respirar oxígeno puro. Pero fue Paul Bert el que, en 1871, estableció las principales bases sobre la toxicidad del oxígeno. En una serie de experimentos, Bert expuso distintos animales, microorganismos y plantas a oxígeno hiperbárico y concluyó que todas las formas de la materia viva son susceptibles a la toxicidad del oxígeno (Ernster, 1986).

Los mecanismos moleculares de la toxicidad del oxígeno fueron postulados en 1954 por Rebeca Gershman y colaboradores, quienes mostraron la semejanza

entre los efectos producidos por irradiación con rayos X y la exposición al oxígeno hiperbárico. A partir de estos resultados postularon la participación de los intermediarios de reducción del oxígeno en ambos procesos.

Con el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa realizado por McCord y Fridovich en 1969, la teoría de la toxicidad del oxígeno tomó fuerza, ya que fue la primer enzima que se encontró que metabolizaba un radical libre del oxígeno (el anión superóxido). Sobre estas ideas se establecieron las bases para la investigación del fenómeno de la toxicidad del oxígeno.

Definición de radicales libres

Los radicales libres son especies químicas capaces de existir en forma independiente (de allí el uso del término libre), que contienen un número impar de electrones. El número impar de electrones se debe a la presencia de uno o más electrones desapareados en sus orbitales más externos (un electrón desapareado es aquel que ocupa un orbital atómico o molecular por sí mismo). La presencia de estos electrones les confiere carácter paramagnético, es decir, son atraídos débilmente a campos magnéticos. Además, en la mayoría de los casos, el hecho de poseer electrones desapareados hace que estas especies químicas sean altamente reactivas y posean una vida media corta (Pryor, 1976).

Los radicales libres en sistemas biológicos pueden ser generados por diversas vías metabólicas. La conversión de ciertas moléculas en radicales libres puede ocurrir en el metabolismo tanto de compuestos endógenos como exógenos. Los radicales libres más relevantes para los sistemas biológicos son los que se encuentran centrados en el oxígeno. También cobran importancia los radicales centrados en el azufre, nitrógeno y aquellos que se generan sobre los metales de transición (Halliwell y Gutteridge, 1999a).

Especies activas del oxígeno

La molécula de oxígeno posee un número par de electrones. Sin embargo, dos de ellos se encuentran desapareados y cada uno se ubica en un orbital antienlazante π^* diferente. Estos electrones tienen el mismo número cuántico de espín (es decir, poseen espines paralelos). Cuando la molécula de oxígeno posee esta configuración, se encuentra en su estado más estable, llamado triplete basal. Es por ello que si el oxígeno oxida a otro átomo o molécula, aceptando electrones por parte de ella, éstos últimos deben poseer un espín antiparalelo a los electrones desapareados del oxígeno, de manera de entrar en el espacio vacante de los orbitales antienlazantes π^* . Este hecho impone una restricción importante en la oxidación de moléculas por oxígeno, ya que hace que tienda a aceptar transferencias electrónicas de a un electrón por vez.

Si el oxígeno molecular en su estado basal acepta un electrón, éste debe entrar en uno de sus orbitales antienlazantes π^* y el producto es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que posee sólo un electrón desapareado. La aceptación de otro electrón da lugar a la formación del ion peróxido (O_2^{2-}) que no es un radical pues no posee electrones desapareados (Figura 1). La adición de otros dos electrones hace que la unión de los dos átomos de oxígeno se rompa, generando dos aniones óxido (O^{2-}).

En general, en sistemas biológicos, los productos de la reducción de dos y cuatro electrones en el oxígeno son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el agua (H_2O), respectivamente. La unión O-O en el peróxido de hidrógeno es relativamente débil por lo que se descompone fácilmente dando lugar al radical hidroxilo (OH^{\cdot}), otro radical producto de la reducción parcial de la molécula de oxígeno (Green y Hill, 1984).

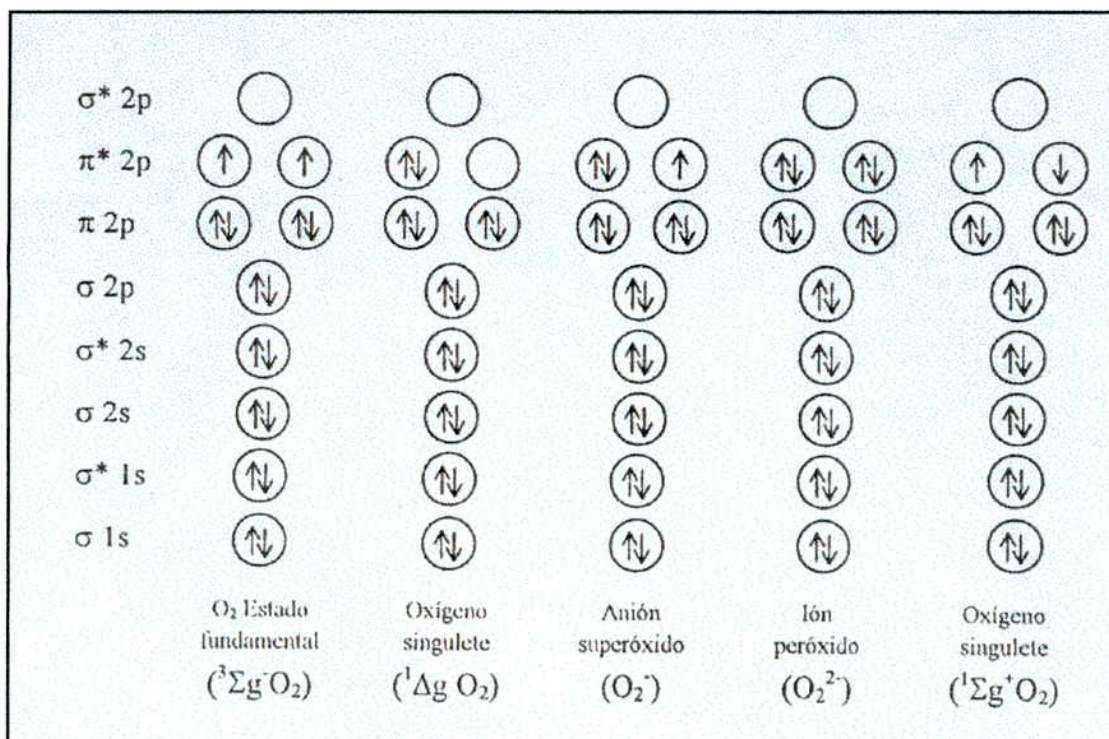
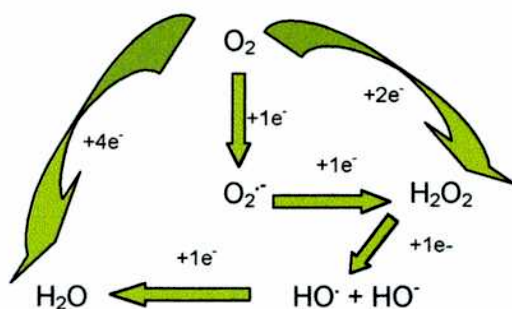


Figura 1. Configuración de los electrones en el oxígeno en su estado fundamental y en las especies activas del oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete) (tomado de Halliwell y Gutteridge, 1999a).

En el siguiente esquema se resume todos los caminos de reducción del O₂ mencionados anteriormente (Winston GW, 1991):



Los productos de la reducción parcial del oxígeno molecular: anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, junto con el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) - un estado excitado del oxígeno molecular -, conforman lo que se denomina especies activas del oxígeno (EAO).

Generación de especies activas del oxígeno

El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son especies activas del oxígeno producidas normalmente durante la reducción biológica del oxígeno por diversos sistemas celulares y subcelulares. A continuación se detallan los diferentes sitios de producción de ambos.

Fuentes de anión superóxido

En la mayoría de las células aeróbicas, las fuentes de $\text{O}_2^{\cdot-}$ más importantes *in vivo* son las cadenas de transporte de electrones presentes en la mitocondria y en el retículo endoplasmático. Mientras las citocromo oxidasa liberan radicales del oxígeno casi no detectables, los electrones que son transportados pueden transferirse directamente hacia el O_2 durante su pasaje entre algunos de los componentes tempranos de la cadena mitocondrial. Esta pérdida (o escape) genera $\text{O}_2^{\cdot-}$. A niveles de O_2 fisiológicos, se ha sugerido que aproximadamente del 1 al 3% del O_2 reducido en la mitocondria puede formar $\text{O}_2^{\cdot-}$. Esta reducida tasa de escape se debe probablemente a las bajas concentraciones de O_2 intramitocondrial y al ordenamiento de los transportadores en complejos, lo que facilita el movimiento de los electrones hacia el siguiente componente de la cadena más que su escape hacia el O_2 . El daño en este orden podría favorecer la pérdida de electrones y el incremento de la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Todavía se debate sobre donde ocurre exactamente la pérdida de electrones, pues están implicados en este hecho tanto los citocromos tipo b, como los constituyentes del complejo I y la forma radical (semiubiquinona) de la coenzima Q (Turrens, 1997).

En la cadena de electrones de las fracciones subcelulares que contienen retículo endoplasmático, fracciones microsomales, se produce $O_2^{\cdot-}$ por una transferencia de electrones lenta al oxígeno a través de las NADPH-citocromo P_{450} y NADH-citocromo b_5 reductasas.

Diversas enzimas del tipo de las oxidasas, como la xantina oxidasa y la aldehído oxidasa son fuentes adicionales de anión superóxido. La enzima xantina oxidasa ha sido implicada como la fuente principal de anión superóxido responsable del daño observado en ciclos de isquemia-reperfusión intestinal (Omar y otros, 1991).

Por otro lado, se ha descrito la generación de $O_2^{\cdot-}$ durante la reoxidación de flavinas y de algunas proteínas autooxidables como las ferredoxinas y hemoproteínas (Fridovich, 1984).

Existen dos oxidasas presentes en fagocitos que producen tanto anión superóxido como peróxido de hidrógeno, dependiendo del dador de protones acoplado a la reacción. La oxidasa que es más afín por NADPH produce $O_2^{\cdot-}$, mientras que la otra es altamente específica para NADH y produce $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Los radicales libres del oxígeno originados durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria parecen estar generados por la enzima dependiente de NADPH (Forman y Thomas, 1986).

Fuentes de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es generado directamente por reducción divalente del oxígeno o indirectamente por dismutación del anión superóxido (reacción 1).



El peroxisoma es el sitio principal de generación de peróxido de hidrógeno de las células de mamíferos. Una gran parte de éste es degradado por la enzima

catalasa dentro de la organela y sólo una fracción del total (20 - 60%) difunde hacia el citosol (Boveris y otros, 1972).

La producción de H_2O_2 por la reducción directa a partir del oxígeno ocurre durante el curso de reacciones catalizadas por una serie de oxidasas tales como monoamino oxidasa, urato oxidasa, D-aminoácido oxidasa, glicolato oxidasa, acetil-CoA oxidasa y otras enzimas de la oxidación de los ácidos grasos, la mayoría de ellas localizadas dentro del peroxisoma (Boveris y Cadenas, 1997).

Considerando toda esta diversidad de fuentes celulares de especies activas del oxígeno puede determinarse que entre un 2 y 5 % es la fracción del oxígeno total consumido por la célula que es reducida a anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Chance y col., 1979). Esto, sumado a la existencia de sistemas de defensa específicos, determina que las concentraciones de H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y especies derivadas se mantengan en valores muy bajos, estimados en el orden de 1×10^{-11} M para el anión superóxido y 1×10^{-7} M para el H_2O_2 (Boveris y Cadenas, 1997).

Estrés oxidativo

En los sistemas biológicos se asocia al estrés oxidativo con un aumento en la velocidad de generación de especies oxidantes o una disminución en la actividad de los sistemas de defensa, que da como resultado un aumento sostenido de las concentraciones en estado estacionario de las especies reactivas del oxígeno. Los radicales libres del oxígeno conducen, primero, a un daño celular reversible que, de persistir, puede derivar en un daño irreversible e incluso la muerte de la célula.

Como consecuencia de: un aumento en la concentración de O_2 ; el metabolismo celular de ciertas toxinas (aloxano, paraquat, adriamicina); la activación de fagocitos; la injuria por radiación; etc, se puede observar una producción aumentada de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en células y tejidos (Halliwell y Gutteridge,

1999b). Aunque ni el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 son especies muy reactivas, ambas, son capaces de producir daño celular por inactivación de enzimas específicas.

Es sabido que el H_2O_2 , en presencia de sales de hierro, aumenta su capacidad de oxidar compuestos orgánicos. Esta mezcla de sales de hierro y H_2O_2 es también conocida como reactivo de Fenton, usualmente utilizado como agente hidroxilante. En 1934, Haber y Weiss, concluyeron que dicha capacidad oxidante provenía de la formación de radicales hidroxilo de acuerdo a las reacciones en cadena que a continuación se detallan (reacciones 2 a 6):



Reacciones en cadena iniciadas por intermediarios de la reducción del oxígeno

Peroxidación de lípidos

El radical HO^{\cdot} se combina con diferentes moléculas biológicas a velocidades que dependen de su difusión. Dada su extrema reactividad y brevísima vida media, reacciona en o cerca del lugar de su formación con moléculas sencillas (alcoholes, adenina, alanina, etc), con ácidos nucleicos, con proteínas y lípidos simples (con una constante de velocidad de $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Como consecuencia, este radical, puede producir daños en el ADN (en sus bases y azúcares, rompiendo la cadena), inactivación de enzimas (generando cambios

que conducen a la alteración de su estructura primaria, secundaria y terciaria, así como también fragmentación y aumento de la susceptibilidad a las enzimas proteolíticas intracelulares) y procesos de peroxidación lipídica (deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados).

La peroxidación de lípidos es un proceso de reacciones en cadena en la que participan las especies reactivas del oxígeno. Estas reacciones en cadena ocurren por mecanismos que se pueden agrupar en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación, se forman radicales a partir de moléculas ordinarias. Luego, los radicales producidos en la etapa de iniciación atacan a otras moléculas con sus electrones apareados en las etapas de propagación, produciendo en cada ataque un nuevo radical. Finalmente, las etapas en las que los radicales se eliminan se conocen como etapas de terminación (Atkins, 1991).

A continuación se describe cada una de las etapas por separado:

Iniciación

El primer paso de la cadena de lipoperoxidación es el ataque de una especie suficientemente reactiva como para sustraer un hidrógeno de un carbono alílico (reacción 7).



Otra forma de reacción de iniciación es aquella que tiene lugar entre metales de transición (como el hierro o el cobre) e hidroperóxidos (ROOH) ya que el producto puede ser el radical hidroxilo (OH[·]), alcoxilo (RO[·]) o peroxilo (ROO[·]) (reacciones 8-10).





Los grupos carbonilos excitados pueden reaccionar con moléculas orgánicas (RH) y de esa manera se generan radicales libres centrados en carbono, capaces de iniciar una cadena de peroxidación lipídica (reacción 11).



Propagación

Cualquiera de la especies mencionadas en el punto anterior es lo suficientemente reactiva como para sustraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso poliinsaturado. La remoción del átomo de hidrógeno se ve facilitada por la presencia de un doble enlace en el ácido graso, que debilita la unión carbono - hidrógeno en el átomo de carbono adyacente al doble enlace. El radical libre centrado en carbono formado tiende a estabilizarse por un reordenamiento molecular, dando lugar a la formación de un dieno conjugado.

En condiciones aeróbicas, la reacción más probable de los dienos conjugados es su combinación con oxígeno que, dado su carácter hidrófobo tiende a concentrarse en el interior de las membranas lipídicas. El producto de esta reacción es el radical peroxilo, ROO^{\cdot} (reacción 12)



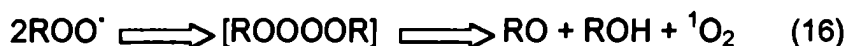
Los radicales peroxilo, por su parte, pueden sustraer un átomo de hidrógeno de otro lípido, como se puede observar en la reacción 13.



De esta manera, tiene lugar una reacción de propagación, ya que el radical carbono formado se combina con otra molécula para generar otro radical, permitiendo que la cadena de peroxidación lipídica continúe.

Terminación

La etapa de terminación incluye a todas aquellas reacciones en las que dos radicales se combinan entre sí, determinando la anulación de dos centros activos (reacciones 14-17).



Las dos últimas reacciones (16 y 17), que representan la reacción entre dos radicales peroxilo, muestran la formación de un producto intermediario tetróxido inestable (Cadenas y col., 1994), que se descompone formando, entre otros productos, oxígeno singlete o una molécula con un grupo carbonilo excitado.

Tanto el oxígeno singlete como los grupos carbonilos excitados pueden retornar a su estado fundamental emitiendo luz que se encuentra en el rango visible del espectro, como se indica en las ecuaciones 18 a 20.



Consecuencias de la peroxidación lipídica

Las membranas biológicas (plasmática, de retículo endoplasmático, mitocondrial, etc), contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados que son muy susceptibles de rupturas peroxidativas inducidas por radicales libres. Los efectos de los procesos de peroxidación de los lípidos de membrana son diversos y se manifiestan como alteraciones en las principales propiedades de las membranas. Se pueden observar cambios en la permeabilidad, viscosidad, y en las transiciones de fase de la bicapa lipídica. Se pueden producir modificaciones en las interacciones lípido - proteína de los distintos componentes de membrana. También puede ocurrir pérdida de la actividad enzimática de los sistemas que se encuentran insertos en las membranas (Farber, 1994).

Sistemas de defensa antioxidante

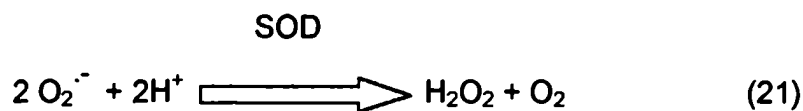
En la célula existen sistemas de defensa específicos encargados de metabolizar las especies activas del oxígeno. Son denominados sistemas de defensa antioxidante y se dividen en dos grupos: defensas antioxidantes enzimáticas y sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos, que a su vez se agrupan en hidrosolubles y liposolubles.

Defensas antioxidantes enzimáticas

Las defensas antioxidantes enzimáticas incluyen a las enzimas denominadas antioxidantes y agrupan a la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es una enzima que cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular de acuerdo a la siguiente reacción:



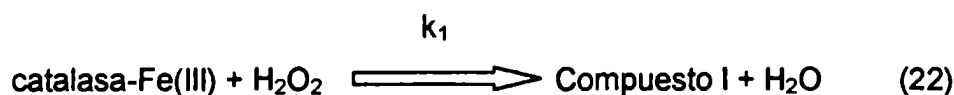
La constante de velocidad de la reacción es de $k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor se encuentra en el límite difusional, lo que significa que la velocidad de reacción queda determinada por la velocidad de difusión de los reactivos a través del medio. La enzima tiene un comportamiento no Michaeliano y no es saturable por sustrato, características debidas a que la reacción catalizada involucra dos etapas en las que dos moléculas del mismo sustrato reaccionan con las formas reducida y oxidada de la enzima (McCord y Fridovich, 1969).

La superóxido dismutasa presenta dos formas en células eucarióticas: la CuZn-superóxido dismutasa y la Mn-superóxido dismutasa. La primera se halla en el citosol y tiene un peso molecular relativo de aproximadamente 32.000. Está formada por dos subunidades proteicas, cada una de las cuales posee un átomo de cobre y un átomo de zinc en su sitio activo y es inhibible por cianuro. La segunda, situada en la mitocondria, posee un peso molecular relativo de 40.000 y está compuesta por cuatro subunidades y un átomo de manganeso por subunidad. Esta forma de la enzima no es sensible al cianuro (Beauchamp y Fridovich, 1973).

Catalasa (CAT)

La catalasa es una hemoproteína que está compuesta por cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene un grupo hemo (Fe (III)-protoporfirina) unido a su sitio activo. Su peso molecular relativo es de 240.000 y su ubicación subcelular es, principalmente, en los peroxisomas.

Esta enzima posee una actividad de peroxidasa específica para el peróxido de hidrógeno, que puede actuar simultáneamente como hidroperóxido y como dador de hidrógeno de acuerdo al siguiente mecanismo de reacción (reacciones 22 y 23):

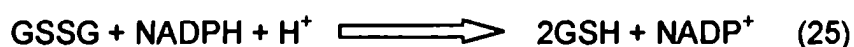




Las constantes de velocidad de estas reacciones (determinadas para hígado de rata) tienen un valor de $k_1 = 1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y de $k_2 = 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Como en el caso de la superóxido dismutasa, la reacción sigue una cinética no Michaeliana y no es saturable en las concentraciones usuales de peróxido de hidrógeno observadas en sistemas biológicos. Esto es debido a que dos moléculas del mismo sustrato reaccionan secuencialmente con las formas libres y complejadas de la enzima (Chance y otros, 1979).

Glutación peroxidasa (GPx)

La glutación peroxidasa cataliza la reacción de hidroperóxidos con glutación reducido (GSH) para formar glutación oxidado (GSSG) y el producto de reducción del hidroperóxido usando como dador de electrones al NADPH (reacción 24 y 25).



La enzima es específica para su donante de hidrógeno, el glutación, y no específica para el hidroperóxido. La falta de especificidad hacia el hidroperóxido extiende el rango de sustratos desde el peróxido de hidrógeno hasta hidroperóxidos orgánicos, entre los cuales los hidroperóxidos de los ácidos grasos de varias estructuras son de particular interés. Posee dos isoformas: una que posee selenio en su sitio activo y otra que no presenta a este elemento en el sitio activo. La glutación peroxidasa selenio dependiente posee un peso molecular relativo de 76.000 y está compuesta por cuatro subunidades (con un átomo de selenio por subunidad). La glutación peroxidasa independiente de selenio presenta dos subunidades y un peso molecular relativo de 46.000 (Flohé y otros, 1973).

La distribución subcelular de la enzima es complementaria a la de la catalasa; dos tercios de la enzima se encuentran en el citosol y un tercio en la mitocondria.

Sistemas antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles

Entre los sistemas antioxidantes no enzimáticos hidrosolubles más importantes puede mencionarse al glutatión, el ácido ascórbico y el ácido úrico.

Glutatión (GSH)

El glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido γ -glutámico, cisteína y glicina. Se encuentra en concentraciones altas en las células de mamíferos (en el orden de 1 a 5 mM) y esto hace que sea el tiol no proteico más importante en tejidos animales. Participa en una gran cantidad de funciones celulares que derivan de la capacidad que posee esta molécula de mantener los grupos tioles proteicos en estado reducido.

El glutatión, además de ser dador de hidrógenos para la glutatión peroxidasa, tiene funciones antioxidantes por sí mismo ya que podría reaccionar en forma directa con especies activas del oxígeno. Se ha descrito la reacción del GSH con el anión superóxido, con el radical hidroxilo y con el oxígeno singulete (reacciones 26-28)

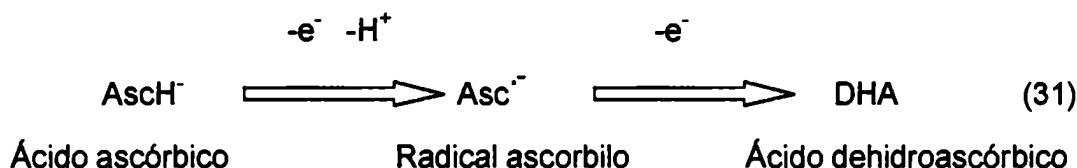


El radical formado en las reacciones 26 y 27 puede, luego, formar un dímero (reacción 29) o reaccionar con oxígeno de acuerdo a lo que se muestra en la reacción 30 (Cadenas, 1989):



Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es un excelente agente reductor. La donación de un electrón por parte del ácido ascórbico dá como resultado el radical semihidroascorbato o ascorbilo ($\text{Asc}^{\cdot-}$), el cual puede ser oxidado para dar ácido dehidroascórbico (DHA) (reacción 31). El radical ascorbilo posee un electrón desapareado altamente deslocalizado en su orbital π y esto hace que sea una molécula relativamente estable poco reactiva.



La pobre reactividad del ascorbilo es la esencia de muchos de los efectos antioxidantes del ácido ascórbico: los radicales libres interactúan con el ácido ascórbico y se forma una buena cantidad del radical ascorbilo, que sufre una reacción desproporcionada regenerando algo del ácido ascórbico. Entre las múltiples funciones del ácido ascórbico como antioxidante, se puede mencionar la propiedad de reaccionar en forma directa con especies activas del oxígeno tales como el anión superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo y el oxígeno singulete (Halliwell y Gutteridge, 1990). También, debe sumarse a este hecho la capacidad que posee esta molécula de regenerar α -tocoferol por reacción con los radicales α -tocoferilo (Packer y otros, 1979).

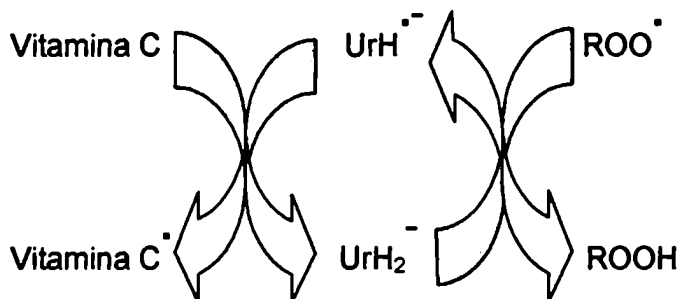
Ácido úrico

En los tejidos animales, el ácido úrico es producido por la oxidación de la xantina y la hipoxantina catalizada por las enzimas xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa. En la mayoría de las especies, otra enzima, la urato oxidasa, convierte el ácido úrico en alantoína. Sin embargo, los tejidos humanos y de otros primates superiores carecen de urato oxidasa. Por lo tanto, el ácido úrico se acumula en los fluidos del cuerpo en concentraciones que se encuentran en el rango de 0,2 a 0,4 mM. A pH fisiológico casi todo el ácido úrico se encuentra ionizado a urato, llevando una carga negativa (Halliwell, 1996).

Se ha postulado que el ácido úrico puede actuar como antioxidante por diversos mecanismos: por su capacidad de unir iones hierro y cobre, como atrapador directo de radical hidroxilo (OH[·]), radical peroxilo (ROO[·]) (reacción 32) y oxígeno singulete (¹O₂) o como inhibidor de la cadena de peroxidación lipídica (Halliwell B. y Gutteridge J., 1999c).



Algunos productos de la reacción del ácido úrico con algunas especies oxidantes pueden dar lugar a radicales del urato, que son capaces de generar daño. Sin embargo, estos radicales del urato pueden ser reducidos por la vitamina C, mostrando otro aspecto de las múltiples funciones antioxidantes del ácido ascórbico (Maples y Mason, 1988).



Sistemas antioxidantes no enzimáticos liposolubles

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos liposolubles más importantes en sistemas biológicos son la coenzima Q, los carotenoides y la vitamina E.

Coenzima Q (ubiquinona)

La coenzima Q cumple una función esencial en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, experimentando simultáneas oxidaciones y reducciones via el radical libre intermediario semiubiquinona (CoQH[•]). La coenzima Q también se halla en otras membranas celulares y lipoproteínas. *In vitro*, el ubiquinol (CoQH₂) puede atrapar radicales RO₂[•] e inhibir la cadena de peroxidación lipídica actuando como dador de hidrógeno para reducir radicales peroxilo, alquilo o alcoxilo (reacción 33)



Un mecanismo alternativo sugiere una interacción entre el ubiquinol y la vitamina E, ésta en su forma de radical (radical tocoferilo), resultando en un reciclado del α -tocoferol vía la coenzima Q (reacción 34) (Halliwell B. y Gutteridge J., 1999c)

Carotenoides

El término carotenoide designa a una familia de compuestos (hay descritos más de 500) que tienen como característica común el ser moléculas de cadena larga que poseen 40 átomos de carbono y un extenso sistema de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides incluyen compuestos tales como β -caroteno, licopeno, luteína y cantaxantina, entre otros.

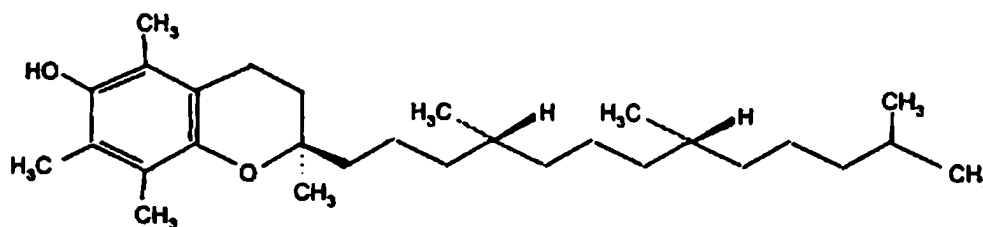
El mecanismo de acción primario por el cual los carotenoides ejercerían su acción antioxidante sería por su capacidad de inactivar al oxígeno singulete. Sin embargo, a esta acción debe agregarse la propiedad de estas sustancias de reaccionar directamente con otras especies activas del oxígeno tales como radicales peroxilo, de esta manera inhibiendo la cadena de peroxidación lipídica (Krinsky, 1989).

Vitamina E

Vitamina E es un término genérico que se utiliza para denominar a todas las especies químicas que exhiben actividad biológica de α -tocoferol. De distintas fuentes naturales se han aislado ocho sustancias con actividad de vitamina E: d- α -, d- β -, d- γ - y d- δ -tocoferol; d- α -, d- β -, d- γ - y d- δ -tocotrienol. Los derivados acetato y succinato de los tocoferoles naturales tienen actividad de vitamina E, como así también los tocoferoles sintéticos y sus derivados.

El conjunto de estas especies químicas posee una estructura compuesta por un anillo cromanólico y una cadena lateral en la posición 2. Los tocoferoles tienen una cadena lateral 4',8',12'-trimetildecilo, llamada cadena lateral fitilo (los tocotrienoles presentan una cadena lateral similar con tres dobles enlaces en las posiciones 3', 7' y 11'). Los α , β , γ , y δ tocoferoles se diferencian entre si por el número y posición de los grupos metilo que forman parte del anillo cromanólico. Todo este grupo de compuestos presenta tres carbonos asimétricos (en la posición 2 del anillo y en las 4' y 8' de la cadena lateral) por lo que existen ocho isómeros ópticos de la molécula. De todos los isómeros y análogos, el RRR- α -tocoferol es el que muestra la actividad biológica más alta y además es el más abundante en plasma y tejidos.

La actividad biológica de la vitamina E se expresa en Unidades Internacionales (UI). Una unidad internacional es equivalente a 1 mg de acetato de rac- α -tocoferol.



El α -tocoferol es prácticamente insoluble en agua pero es muy soluble en aceites, acetona, alcohol, cloroformo, benceno y otros solventes orgánicos. En ausencia de oxígeno, es estable al calor, en solución alcalina y no se degrada en solución ácida hasta temperaturas de 100 °C. Sin embargo, los tocoferoles se oxidan muy lentamente en presencia de oxígeno atmosférico y la oxidación puede ser acelerada por exposición a la luz, al calor y por presencia de sales de cobre y hierro. Los productos de oxidación incluyen al tocoferóxido, la tocoferil quinona y la tocoferil hidroquinona, así como dímeros y trímeros. Los ésteres del grupo hidroxilo cromanólico son mucho más estables en presencia de oxígeno. Es por esta razón que el tocoferol que se provee comercialmente es el acetato de α -tocoferol (Machlin, 1984).

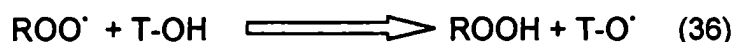
El α -tocoferol, por su naturaleza lipofílica, se localiza en la región no polar de membranas biológicas y lipoproteínas. Se asume que esta molécula se ubica dentro de la bicapa lipídica con el anillo cromanólico orientado hacia la región hidrosoluble de la superficie de la membrana y la cola lateral fitilo sumergida en la región no polar de la misma. Se ha sugerido que esta estructura molecular permite las interacciones fisicoquímicas altamente específicas que tienen lugar entre su cadena fitilo y algunas de las cadenas de los fosfolípidos de membrana. La unión que se establece a través de la cadena no polar en la región hidrofóbica de la membrana produce un "anclaje" de la molécula dentro de la bicapa e inhibe el intercambio de α -tocoferol entre membranas en ausencia de otros factores que puedan mediar en el proceso (Diplock, 1983).

El α -tocoferol (TH) actúa como antioxidante principalmente por su acción atrapadora de radicales libres. Posee la capacidad de reaccionar con radicales alquilo ($R\cdot$), peroxilo ($ROO\cdot$) y alcoxilo ($RO\cdot$), cediendo un hidrógeno lábil de acuerdo a la reacción 35:



De esta manera inhibe la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Burton e Ingold, 1981). Es importante mencionar el hecho que la distribución de α -tocoferol en tejidos y fluidos biológicos muestra una correspondencia estrecha tanto con la concentración de ácidos grasos poliinsaturados como con la concentración de oxígeno a la que están expuestos, lo que indicaría que las concentraciones de este antioxidante son mayores en los sitios en los que la peroxidación lipídica está favorecida (Kornburst y Mavis, 1980, Burton y otros, 1983).

Con respecto al mecanismo por el cual el α -tocoferol inhibe los procesos de peroxidación lipídica, se acepta que el α -tocoferol actúa principalmente cediendo el átomo de hidrógeno perteneciente al grupo hidroxilo fenólico de acuerdo a la siguiente reacción:



El Océano Austral

El Océano Austral es una enorme expansión de agua de mar helada que rodea a la Antártida. Puede imaginarse como la unión de los extremos Sur del Pacífico, Atlántico e Índico formando un anillo alrededor de la Antártida y se extiende hacia el norte hasta la Convergencia Subtropical. Considerando estos límites, las aguas costeras del extremo Sur de Sudamérica y la isla Sur de Nueva Zelanda quedan incluidas en el Océano Austral.

El Océano Austral es una región biogeográfica inusual dado que posee un límite muy bien definido conocido como el Frente Polar o Convergencia Antártica (Figura 2). Este fenómeno se produce por una discontinuidad relativamente abrupta de las temperaturas de superficie entre las aguas que provienen de Antártida hacia el Norte (3-4 °C en verano) y las frías templadas del Norte que van hacia el Sur (6-8 °C). La porción del Océano Austral situada entre el continente antártico y el Frente Polar abarca 35 millones de km² (aproximadamente el 10% de los océanos del mundo). Éste es el hábitat de los peces antárticos actuales, una fauna marina exclusiva.

La historia de la vida sobre la Tierra ha mostrado que las condiciones climáticas nunca han sido estables. Durante los últimos 55 millones de años, la evolución de la fauna ictícola ha tenido lugar en el Océano Austral acompañando la reducción en temperatura desde 20 °C hasta los extremos de frío polar observados en la actualidad (-1.86 °C) (Clarke y Johnston, 1996). A través de la historia evolutiva se ha observado que la respuesta natural de los organismos a cambios climáticos lentos consistió en desarrollar un cambio paralelo en rangos de distribución geográfica. Sin embargo, para una fauna constituida esencialmente por peces de aguas poco profundas, aislados por amplias extensiones de agua de mar profunda, tal cambio en su distribución está geográficamente limitado. Siguiendo el paulatino aislamiento de la Antártida, la fauna de aguas poco profundas existente fue forzada a adaptarse al cambio climático o extinguirse.

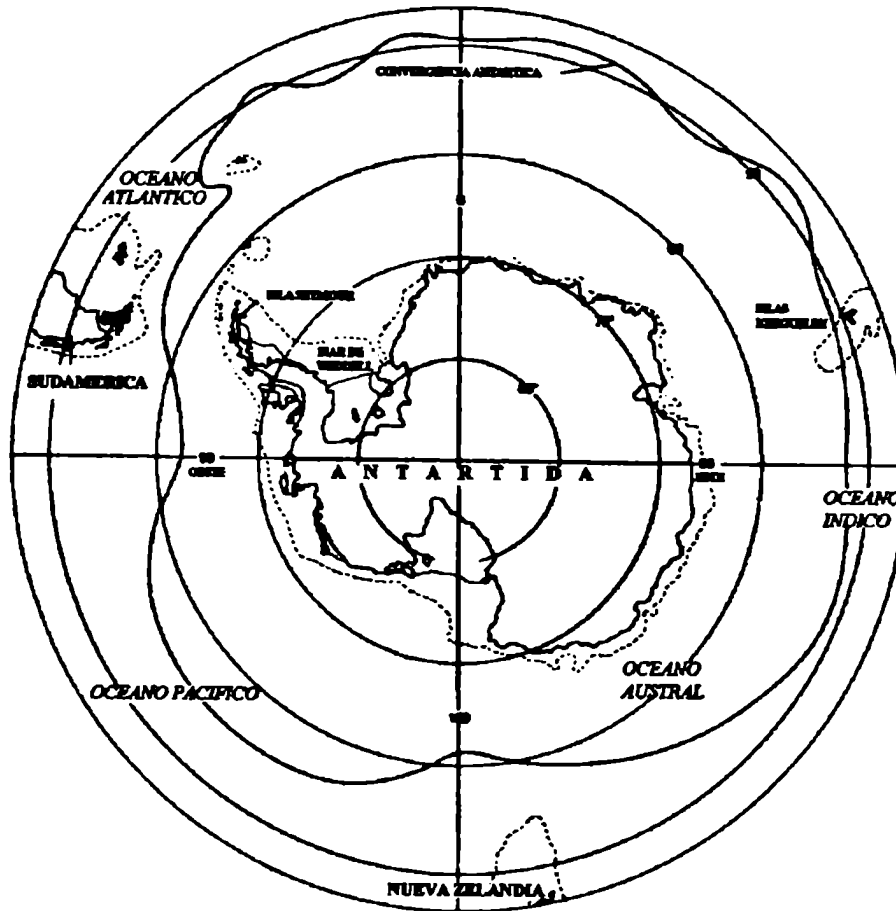


Figura 2. Mapa del Océano Austral donde se muestra la zona que abarca la Convergencia Antártica (tomado de Eastman, 1993)

Aunque el aislamiento y las bajas temperaturas han jugado un papel preponderante en la evolución de los peces actuales, también han tenido gran importancia otros factores como la pérdida de hábitat y los ciclos climáticos. Las aguas del Océano Austral, que exhiben poca variabilidad en temperatura, se caracterizan por una notable dependencia de la productividad primaria ligada a los cambios estacionales (Clarke, 1988). La baja temperatura puede facilitar la supervivencia de estadios larvales en los peces bajo estas condiciones, pero

también ejerce limitaciones en las tasas de los procesos metabólicos a través de la restricción del modo de vida que pueda ser adoptado.

Es sorprendente la escasa diversidad presente en los peces antárticos que habitan el Océano Austral, sin embargo, tal hecho se contrapone con la riqueza y diversidad de muchos taxa de invertebrados. La riqueza de la fauna está relacionada con la diversidad de hábitats disponibles. La relativamente baja diversidad de especies de la fauna ictícola del Océano Austral puede ser explicada en parte por la reducción o ausencia de hábitats tradicionalmente ricos en especies de peces. Casi no hay estuarios y la existencia de áreas sublitorales de aguas poco profundas es rara excepto en el área de la Península Antártica.

Una reciente recopilación de las especies de peces bénticos, realizada desde el continente hasta la zona de la Convergencia Antártica, muestra el predominio numérico del suborden Notothenioidei, por ejemplo, de las 174 especies de peces bénticos o demersales conocidos del Océano Austral, no menos de 95 (55%) son nototenoideos. Ningún otro ecosistema oceánico presenta el dominio tan marcado de un solo grupo taxonómico de peces. Queda claro, tanto a partir de las evidencias moleculares como de los cladogramas, que los nototenoideos han sufrido una marcada radiación adaptativa en las aguas poco profundas que rodean a la Antártida. Sin embargo, muchas especies siguen conservando su hábito béntico o demersal, reflejando el modo de vida béntico de sus ancestros. En los taxa ancestrales, la pérdida de la vejiga natatoria funcional ha ejercido significativas limitaciones sobre los subsecuentes procesos de radiación. Esto significa que aquellas especies que penetraron en la mitad de la columna de agua abandonando el fondo marino, debieron desarrollar otros cambios para ajustar su flotabilidad (reducción del número de escamas, reducción de la osificación del esqueleto y acumulación de lípidos en extensos depósitos), haciendo que la existencia en este nuevo hábitat fuera energéticamente posible. Se ha estimado que casi la mitad de los nototenoideos vivientes se han movido hacia nichos ecológicos no bénticos convirtiéndose en epibénticos, pelágicos, semipelágicos y criopelágicos (Eastman, 1993).

En los peces antárticos, los cambios evolutivos que han ocurrido a escala molecular en muchas proteínas enzimáticas y estructurales, permitieron sostener actividades metabólicas comparables a aquellas observadas en peces de aguas templadas (Somero y otros, 1998; Detrich III, 1998). Del mismo modo se ha descrito que los lípidos juegan un importante papel tanto en la flotabilidad neutra (Eastman, 1993) como en el aporte de combustible para el metabolismo (Crockett y Sidell, 1990). En este último caso, en estudios de selectividad por el sustrato hechos en músculo cardíaco y pectoral, se ha determinado que el metabolismo de los peces antárticos muestra una marcada preferencia por el uso de ácidos grasos poliinsaturados como combustible (Sidell, 1991; Crockett y Sidell, 1993).

En todos los miembros de la familia Channichthyidae, conocidos como peces de hielo, la pérdida de eritrocitos funcionales ha sido el cambio evolutivo más sorprendente. Como parte de la tendencia evolutiva general de los peces de aguas heladas, el decremento en el hematocrito y en la concentración de hemoglobina (típico de todos los nototenoideos), está asociado a una baja demanda metabólica y a una alta solubilidad del oxígeno en agua de mar y en plasma (Eastman, 1993). Sin embargo, solo en los peces de hielo esta tendencia llega al extremo de haber perdido todos sus pigmentos respiratorios.

El agua de mar saturada a 0 °C contiene hasta 1.6 veces más oxígeno que a 20 °C, aunque esta relación puede variar con el pH, la turbulencia y la demanda biológica de oxígeno (Clarke, 1983). La formación de radicales libres podría tomarse sencilla en presencia de altas concentraciones de oxígeno disuelto en agua de mar helada (Dirks et al., 1982). Es de esperar, entonces, que los peces antárticos posean un sistema de defensa antioxidante efectivo adaptado a las condiciones ambientales extremas que les permita contrarrestar a las especies activas del oxígeno y sus derivados.

Anexo 1

Origen del Suborden Notothenioidei

Los nototenoideos (orden Perciformes) son el grupo dominante en la fauna antártica comprendiendo 95 de las 274 especies de peces antárticos, lo que constituye el 34,7 % del total. Esta dominancia se hace más evidente si sólo se consideran las especies bentónicas, constituyendo los nototénidos en este caso alrededor del 54 % de las especies (Eastman, 1993). Sin embargo, esta importante proporción de especies pertenecientes al Suborden no da una idea exacta de la importancia ecológica del mismo, la que se hace más evidente tanto en el número de individuos como en la biomasa de nototénidos presentes en aguas de la plataforma marina antártica. El origen de este conjunto altamente endémico de las aguas antárticas no ha podido establecerse con certeza, ya que hasta el presente no se han encontrado registros fósiles posteriores al Eoceno (Clarke y Johnston, 1996). Desde hace décadas, la hipótesis más aceptada es que han evolucionado *in situ* en las aguas someras que rodean al continente antártico mediante una adaptación gradual al enfriamiento del Océano Austral durante el Terciario (Reagan, 1914; Norman, 1937; De Witt, 1971). Estos peces habrían evolucionado a partir de un stock de Perciformes, probablemente demersales, en un período comprendido entre los 25 y 5 millones de años antes de la actualidad (Clarke y Johnston, 1996). Hace aproximadamente 25 millones de años se produjo la apertura del pasaje de Drake, lo que permitió el establecimiento de una corriente circumpolar, que rodea al continente antártico y separa masas de agua con distintas características, especialmente en cuanto a la temperatura (Eastman y Grande, 1989). El establecimiento de esta corriente, llamada Convergencia Antártica, produjo una zona de cambio brusco de la temperatura del agua (3-4 °C en aguas antárticas y 6-8 °C en aguas subantárticas, restringiendo el intercambio de la ictiofauna entre ambas (Clarke y Johnston, 1996). Este aislamiento podría ser el responsable de la baja diversidad específica hallada en aguas antárticas cuando se la compara con la diversidad del Ártico (Eastman, 1993). La

Convergencia Antártica constituye una barrera para los organismos pelágicos, mientras que los organismos bentónicos tienen sus distribuciones restringidas por las profundas cuencas marinas que también actuarían como una barrera natural contra la dispersión (Ekau, 1991). Las especies confinadas a vivir en la zona interior a la Convergencia Antártica experimentan condiciones ambientales muy extremas: una gran estacionalidad, tanto en la iluminación como en la productividad primaria, y temperaturas cercanas al punto de congelación. No obstante, han tenido la posibilidad de desarrollar adaptaciones muy especializadas para enfrentar estas condiciones adversas en el curso de la evolución, ya que dentro de la Convergencia las condiciones ambientales son muy predecibles desde el momento de su establecimiento.

El enfriamiento del Océano Austral durante los últimos 100 millones de años, sin embargo, no habría sido un episodio único y continuo. Se han identificado una sucesión de 10 episodios de enfriamiento - calentamiento durante los últimos 65 millones de años (Cenozoico) (Clarke y Crame, 1992). Este hallazgo permitió generar hipótesis sobre la existencia de períodos con un intercambio significativo de especies de altas y bajas latitudes, lo que actualmente se ha comenzado a corroborar a través del registro fósil (Crame, 1993). Aún más sorprendente es que, a medida que progresan los estudios taxonómicos de la paleofauna antártica, se hace evidente que una gran variedad de taxa tiene una contraparte en el hemisferio norte. Existe evidencia incluso de que especies de ciertos géneros de moluscos han alcanzado una distribución bipolar en el pasado reciente (hace alrededor de 3 millones de años) (Crame, 1993). Resumiendo, a pesar de la existencia actual de una verdadera barrera en la dispersión de los organismos constituida por la Convergencia Antártica, los registros de las paleotemperaturas indican que alrededor del 96 % del tiempo de la era Cenozoica la diferencia de temperatura existente entre las aguas superficiales antárticas y subantárticas fue menor a la que se registra en la actualidad (Crame, 1993), con lo que la evolución de los organismos antárticos puede haberse dado con un menor grado de aislamiento del que antes se pensaba.

Taxonomía

Actualmente la taxonomía de los nototenoideos está siendo revisada en forma exhaustiva (Andersen, 1984; Balushkin, 1990, 1991; Lecointre y otros, 1997; Ritchie y otros, 1997). A pesar de las muy variadas aproximaciones que se plantean a este problema, que incluyen desde caracteres morfológicos hasta técnicas sofisticadas a nivel molecular, no se ha encontrado hasta el presente alguna que sustente una filogenia de amplia aplicación. La construcción de árboles filogenéticos basados en ADN no ha podido resolver las relaciones de las familias en ausencia de grupos externos con algún parentesco (Lecointre y otros, 1997; Ritchie y otros, 1997) (Figura 3).

En una serie relevante de estudios evolutivos se ha investigado al suborden Notothenioidei por su marcado endemismo, sus adaptaciones fisiológicas y su dominancia en el ambiente marino antártico (Eastman y Grande, 1989; Eastman, 1993; Clarke y Johnston, 1996). Este grupo representa, además, un importante recurso económico ya que varias especies han sido objeto de intensa explotación pesquera, como por ejemplo: la trama gris (*Notothenia squamifrons*), la trama jaspeada (*Notothenia rossii*), el draco rayado (*Champsocephalus gunnari*) y, recientemente, la merluza negra (*Dissostichus eleginoides*) (Kock, 1992; Kameya y Lleellish, 1999).

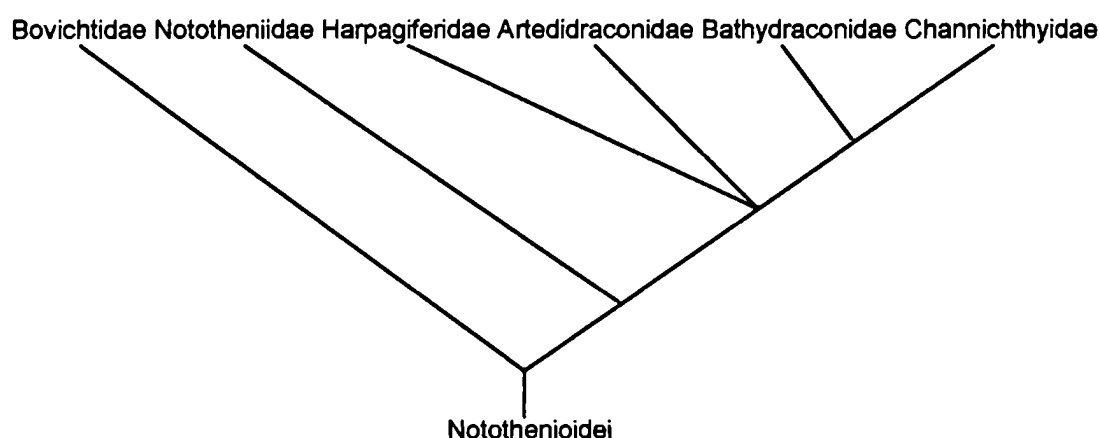


Figura 3. Cladograma donde se muestran las hipotéticas relaciones entre las familias del suborden Notothenioidei (Pisces, Perciformes) (tomado de Eastman, 1993).

El grupo se separa del resto de los perciformes por una combinación de características morfológicas que le son propias:

- Una narina a cada lado de la cabeza.
- Aletas sin espinas punzantes.
- Ausencia de vejiga natatoria.
- Tres radios pectorales planos.
- Costillas pleurales ausentes o pobremente desarrolladas y flotantes.
- Presencia de 2 o 3 líneas laterales, ocasionalmente una.
- Aletas pélvicas de posición yugular.
- Generalmente menos de 15 radios principales en la aleta caudal.

Descripción de las familias analizadas según W. Fischer y J.C. Hureau (1985)

Familia Nototheniidae

Nombres comunes: Bacalaos o abadejos de las rocas (Antárticos o Australes).
Dientudos. Noties

Son peces de tamaño pequeño a muy grande (los del género *Dissostichus* llegan hasta los 200 cm de largo). El cuerpo es de forma algo elongada. La cabeza es grande y poco o muy deprimida. Los ojos son grandes, a veces vueltos hacia arriba. El hocico es moderado. La boca es protractil, situada en forma oblicua. La mandíbula baja es mas larga que la alta, con la maxila llegando hasta casi por debajo de los ojos. Los dientes, presentes en las dos mandíbulas, son villiformes o cardiformes. A veces con algunos dientes fuertes tipo canino, ordenados en una o dos hileras. Paladar sin dientes. Opérculo y preopérculo sin espinas. El opérculo, con un margen que se protruye hacia el borde superior de la base de la aleta pectoral. Las membranas branquiales forman un pliegue a través del istmo; 6 o 7 rayos branquiostegales. Los raks branquiales son generalmente cortos y no numerosos. Poseen dos aletas dorsales, la primera con una base corta y espinas flexibles, bien separada de la segunda aleta, que no posee espinas y es muy larga. La aleta anal es muy larga y sin espinas (de manera ocasional aparece una

sola espina). Las aletas pectorales son anchas y de tipo abanico. Las aletas pélvicas son fuertes y de posición yugular. La aleta caudal tiene forma usualmente redondeada, a veces trunca o de horquilla. El cuerpo está totalmente cubierto por escamas salvo algunas partes de la cabeza que pueden no tenerlas. Las escamas son del tipo ctenoide (ásperas al tacto) o cicloides (suaves), generalmente cubiertas por una gruesa capa de moco. Hay presentes de 1 a 3 líneas laterales, generalmente 2, cubiertas o no por escamas tubulares. Los cercos pectorales tienen todos sus radios sobre el coracoides. El esqueleto caudal posee 5 huesos hipurales y 3 epurales, que pueden estar fusionados entre sí en mayor o menor medida de acuerdo al género.

Color: son generalmente grises con parches oscuros o negros; algunas especies poseen un patrón típico con varios colores brillantes: amarillo, rojo, azul y verde.

La distribución de esta familia de peces netamente marinos es muy amplia en altas latitudes del Hemisferio Sur. Forma el mayor ensamble de los peces antárticos (49 especies) y es la más diversa en relación con la estructura, hábitat y distribución.

Familia Channichthyidae.

Nombres comunes: Peces de hielo.

Son peces de tamaño pequeño a moderadamente grandes. El cuerpo es siempre elongado y fusiforme. La cabeza es muy grande y ancha, fuertemente deprimida de forma dorsoventral. La estructura ósea es generalmente visible a través de la piel de la cabeza. Los ojos son grandes. La boca es grande, terminal, no protractil. La mandíbula rara vez se protruye. La maxila llega hasta la zona ubicada por debajo de la mitad del ojo. Los dientes son del tipo cardiforme en ambas mandíbulas, a veces alargados. El palatino es ligamentoso. El opérculo generalmente presenta lomas en forma de radios que terminan en varias espinas. Las membranas branquiales son muy estrechas unidas al istmo o formando un pliegue a través de él. Poseen 6 rayos branquiostegales, rara vez 5 o 7. Los raks

branquiales son vestigiales, cortos o desarrollados como nudos dentíferos o parches. Poseen dos aletas dorsales, la primera con base corta o larga y con espinas generalmente flexibles y largas, bien separada de la segunda aleta dorsal que posee una base muy larga y no posee espinas. La aleta anal es muy larga y sin espinas. Las aletas pectorales son anchas y de tipo abanico. Las aletas pélvicas son fuertes y en posición yugular, con rayos muy largos en algunas especies, con y sin espinas. La aleta caudal tiene forma redondeada, trunca o emarginada. El cuerpo no tiene escamas. Hay presentes 2 o 3 líneas laterales, a veces cubiertas por láminas óseas o escamas tubulares. El esqueleto caudal posee: los huesos hipurales 1 y 2 fusionados en una lámina ancha; los huesos hipurales 3, 4 y 5 fusionados entre sí y con un centro vertebral ural. Los huesos epurales 2 y 3 están siempre fusionados.

Los Channichthyidae son organismos únicos entre todos los peces, de hecho, entre todos los vertebrados por su pérdida completa (o casi) de hemoglobina en sus células sanguíneas, lo que resulta en una sangre de aspecto transparente o casi blancuzca.

Color: son generalmente blancuzcos con numerosas manchas o bandas negras; algunas especies pueden tener color rojo brillante.

Todos los peces de hielo son estrictamente marinos y están confinados (excepto una especie sub Antártica: *Champscephalus esox*) a las aguas heladas del Océano Austral (15 especies).

Clasificación taxonómica de los animales analizados en el presente trabajo
(Eastman, 1993)

Phylum VERTEBRATA

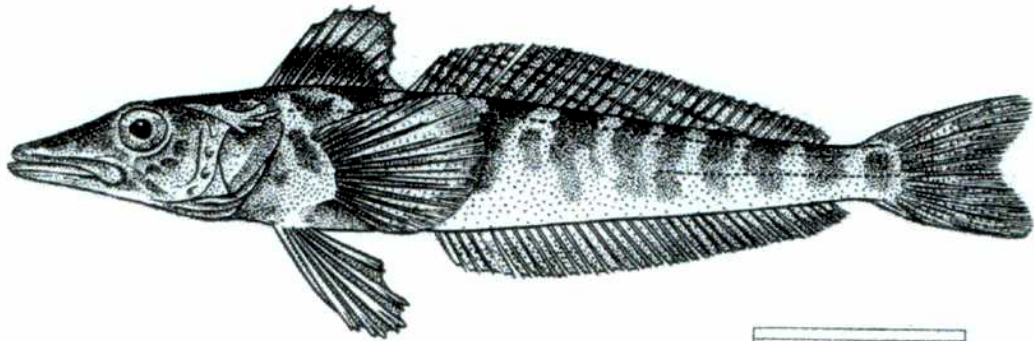
Superclase GNATHOSTOMATA

Clase OSTEICHTHYES

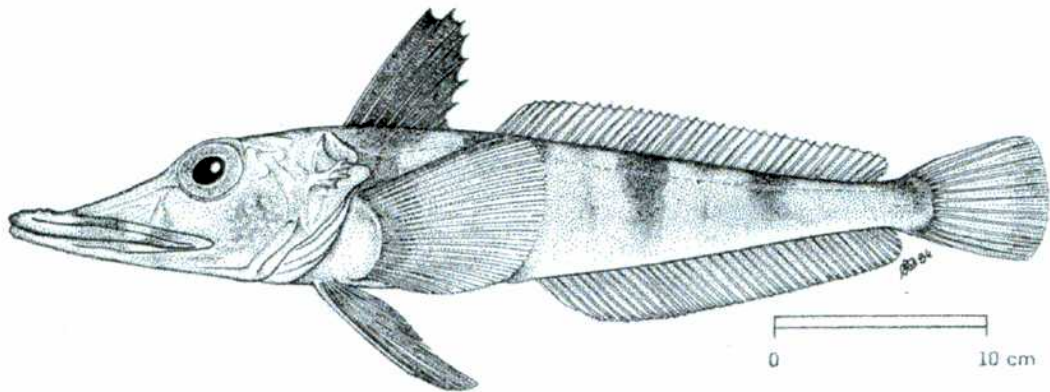
Orden Perciformes

Suborden Notothenioidei

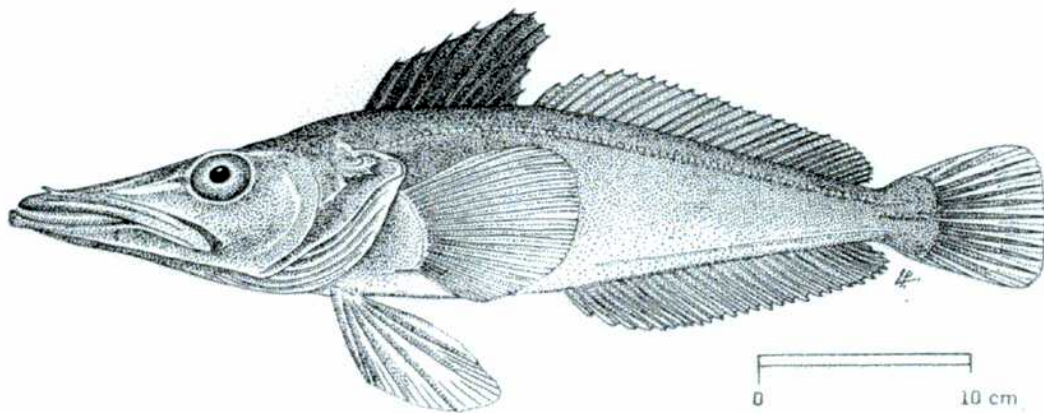
Familia Channichthyidae (peces de hielo)



Champsocephalus gunnari

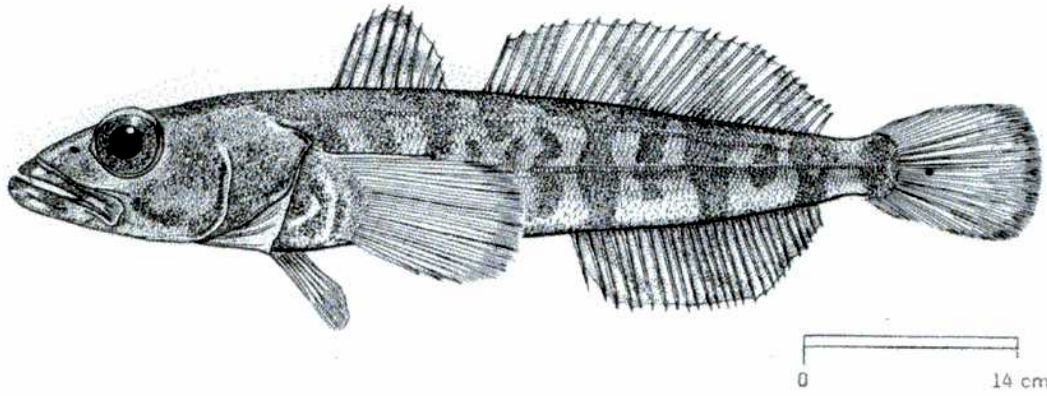


Chaenocephalus aceratus

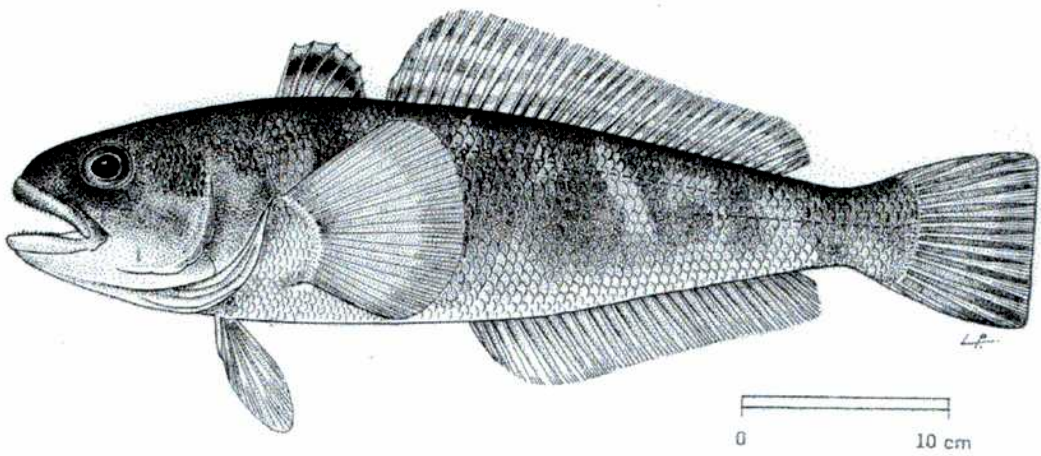


Pseudochaenichthys georgianus

Familia Nototheniidae (nototenias)



Dissostichus eleginoides



Notothenia rossii

Anexo 2

Características físicas de las islas Georgias del Sur

Las islas Georgias del Sur son un conjunto de islas ubicadas entre los paralelos 53° 58' y 54° 55' latitud Sur y los meridianos de 35° 42' y 38° 20' longitud Este que comprenden en su totalidad una superficie de 3850 km². Están constituidas por dos plataformas separadas por una depresión profunda, que puede ser considerada el extremo septentrional del arco del Scotia. La plataforma más grande corresponde a la Isla San Pedro mientras que la menor, situada al noroeste, contiene a las Rocas Cormorán y Negra. Ambas plataformas tienen una profundidad media del orden de los 300 metros y terminan en taludes muy abruptos.

La circulación de las aguas en la zona es muy variable ya que depende del equilibrio entre la corriente circumpolar proveniente del Oeste (deriva del Oeste) y la mezcla entre aguas del Pasaje Drake, Mar de la Flota y Mar de Weddell, que llegan por el sur. Esto determina dos posibles situaciones en el flujo oceánico alrededor de la Isla San Pedro: el dominio de la Corriente Circumpolar en ambas caras de la isla o el aporte de aguas del Mar de Weddell que llegan hasta la plataforma y viran hacia el norte y el noroeste (Atkinson y Peck, 1990). Este último caso es el más frecuente y, en estas condiciones, llega hasta la plataforma de la Isla San Pedro (e incluso hasta las Rocas Comorán) fauna antártica (Marschoff, 1997). El frente de talud se encuentra muy desarrollado, determinando escasos intercambios entre aguas oceánicas y de la plataforma.

Se plantea que dichas islas son continuación de los andes patagónicos y que habrían quedado aisladas del continente sudamericano entre fines del Mesozoico y principios de Cenozoico.

Las islas Georgias del Sur se ubican dentro de la subárea estadística antártica 48.3, definida así por la Comisión para la Conservación del Ambiente y los Recursos Marinos Antárticos (CCAMLR) (Fisher y Hureau, 1985).

Las hipótesis planteadas son:

1) Las bajas temperaturas extremas antárticas determinaron la capacidad de adaptación de los peces. En tales condiciones, la necesidad de conservar la fluidez de las membranas, en mitocondrias y otras organelas, fue suplida por el incremento en su constitución de fosfolípidos y ácidos grasos no saturados. Este hecho sumado a la elevada concentración de O₂ disuelto en el agua de mar a baja temperatura favorece los procesos de peroxidación de lípidos. Por lo tanto, los distintos tejidos de los peces antárticos deben presentar niveles de antioxidantes acordes a la defensa y protección de dichas membranas.

2) En los peces de hielo la ausencia de un transportador eficiente de oxígeno en sangre, como la hemoglobina, habría generado cambios estructurales y funcionales que les permitieron adaptarse y desarrollarse en un ambiente de características climáticas extremas. Dichos cambios podrían ser analizados a través del estudio fisiológico e histológico a escala celular y tisular.

2a) La drástica disminución de las células sanguíneas, que contienen una fracción importante de la enzima antioxidante SOD (Wdzięczak y otros, 1980; Scott y Harrington, 1990), generan respuestas metabólicas (bioquímicas) específicas en los peces de hielo.

2b) Las branquias de los peces de hielo deben presentar adaptaciones estructurales que facilitan el intercambio gaseoso en ausencia de un transportador efectivo como la hemoglobina.

B

Como objetivos del presente trabajo de Tesis:

Se determinarán las diferencias funcionales, entre los sistemas de defensa antioxidante, de dos familias de peces antárticos: *Nototherniidae* y *Channichthyidae*, con y sin hemoglobina respectivamente.

Con este fin:

a) Se medirán, en cada especie de pez, las actividades de las principales enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx), así como los niveles de vitamina E y la capacidad antioxidante total (TRAP) en branquias, corazón, músculo e hígado.

b) Se medirá la actividad de SOD en muestras de sangre de cada especie.

c) Se analizarán características morfológicas y morfométricas de las branquias de las dos familias de peces antárticos, observando las diferencias a nivel estructural.

En todos los casos se evaluarán los resultados obtenidos considerando las comparaciones intra e inter especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de los especímenes y toma de muestras

Los especímenes utilizados en el presente estudio se colectaron durante las campañas realizadas por el Buque de Investigación Pesquera (BIP) Dr. Eduardo L. Holmberg (INIDEP, Mar del Plata), en aguas cercanas a las islas Georgias del Sur (Figura 4), a fin del verano y comienzo del otoño en los años 1996 y 1997.

La pesca se realizó mediante redes de arrastre a una profundidad que varió entre los 400 y 500 metros.

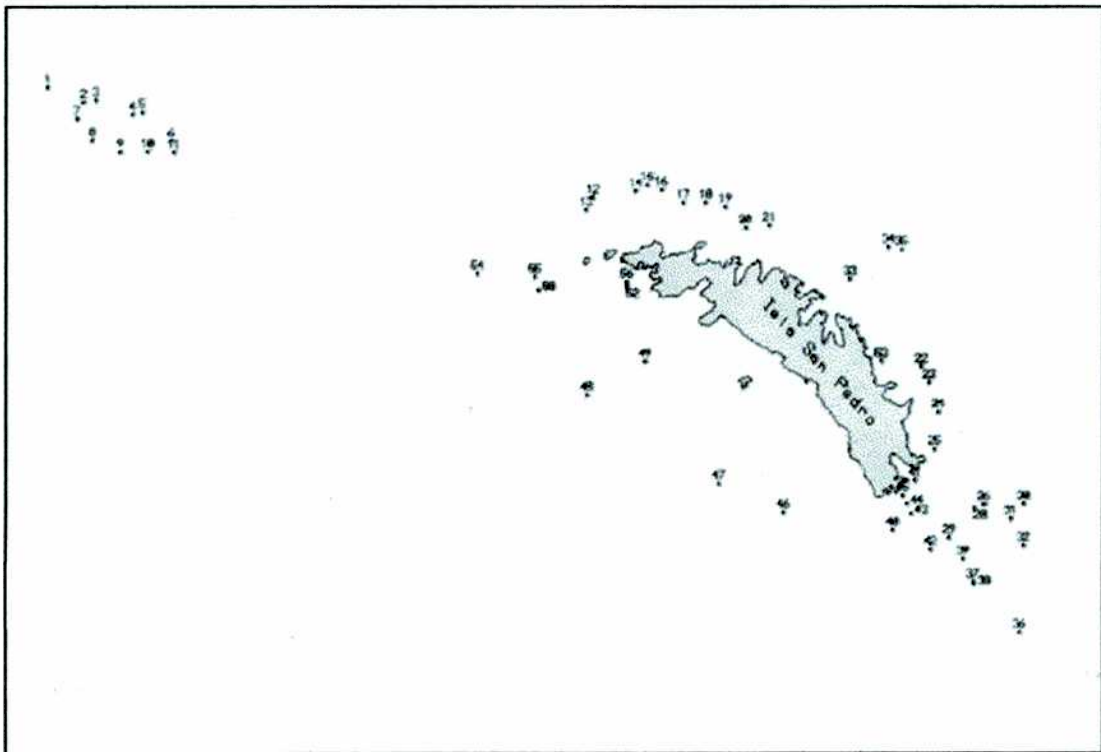


Figura 4. Mapa de las islas Georgias del Sur. Los puntos detallan las zonas donde se efectuó la recolección de los ejemplares.

Se trabajó con las siguientes especies de peces antárticos: *Notothenia rossii* y *Dissostichus eleginoides*, pertenecientes a la familia Nototheniidae (nototénidos, peces de sangre roja), *Chaenocephalus aceratus*, *Champscephalus gunnari* y *Pseudochaenichthys georgianus*, pertenecientes a la familia Channichthyidae (peces de hielo, de sangre incolora).

En cada captura los especímenes fueron separados por especie, por sexo, medidos (longitud total) y pesados, de acuerdo al protocolo de trabajo desarrollado por Marschoff y otros (1994).

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante jeringas hipodérmicas, previamente heparinizadas, a través de la punción del bulbo arterial del corazón (Eastman, 1993) y se conservaron en frío hasta el momento en que fueron procesadas. Luego se procedió a la disección de las muestras de branquias, corazón, músculo e hígado, congelándose las en forma inmediata a -30° C. De esta manera fueron mantenidas hasta su procesamiento en el laboratorio.

Colección de muestras para microscopía óptica

Una vez capturados los ejemplares de *N. rossii*, *D. eleginoides*, *C. gunnari* y *P. georgianus*, se procedió a la disección de los arcos branquiales y sus branquias e inmediatamente después, se sumergió el material en la mezcla fijadora de Bouin (ácido pícrico, formol y ácido acético) durante 12 horas. Las muestras se transfirieron luego a alcohol 70° donde se conservaron hasta su procesamiento.

Preparación de los homogenatos tisulares

Las muestras de tejidos que serían procesadas para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes, el contenido de vitamina E y la capacidad antioxidante total, fueron homogeneizadas en una solución tampón de fosfato de sodio (20mM, pH 7.4), cloruro de potasio (0.15 M), Tritón X-100 (0.1 % v/v) y fenilmetil-sulfonilfluoruro (PMSF, 0.1 mM). Este último fue utilizado como inhibidor

de la actividad de proteasas (Schwarzbaum y otros, 1991). La relación masa de tejido / volumen de solución tampón fue de 1 gramo de tejido en 9 mL de solución.

La homogeneización se llevó a cabo a una temperatura de 4 °C, con un homogeneizador teflon-vidrio.

Se centrifugó a la misma temperatura, a una velocidad de 12000 rpm (10000g) durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada.

El pellet fue descartado y el sobrenadante fue nombrado, por convención, como el homogenato donde se realizaron los estudios (según Wilhelm-Filho y otros, 1993, con pequeñas modificaciones).

Preparación de los extractos eritrocitarios

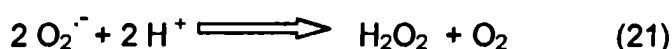
Inmediatamente después de obtenidas las muestras de sangre, se las sometió a centrifugación, con el objeto de separar las células sanguíneas del plasma, durante 5 minutos a una velocidad de 2500 rpm (900g). Mediante pipetas plásticas descartables se separó el plasma de la fracción eritrocitaria, cuidando de no hemolizar las muestras. En el caso de los peces de hielo, se trabajó de igual manera conservando la fracción de células sanguíneas siguiendo los criterios empleados por Ciardello y otros (1997).

Una vez aislada la fracción de células sanguíneas, se las lavó tres veces seguidas con solución fisiológica, para descartar la interferencia que pudiera provocar la presencia de células de la serie blanca. A cada lavado le siguió una centrifugación similar, en tiempo y velocidad, a la anteriormente mencionada. El sobrenadante fue descartado en cada oportunidad. El pellet de células sanguíneas fue hemolisado, mezclando un volumen similar de agua destilada helada y agitando fuertemente mediante vortex durante 2 minutos. En este hemolisado, utilizando un volumen similar, se procedió a la extracción mediante una mezcla de solventes orgánicos compuesta por cloroformo – etanol (3:5). Se agitó en vortex y se centrifugó a 5000 rpm (1800g) durante 15 minutos. El sobrenadante acuoso fue congelado para el posterior análisis de actividad de SOD.

Determinación de las actividades enzimáticas

Actividad de superóxido dismutasa

La actividad de esta enzima se define en términos de su habilidad para inhibir un sistema de detección que reacciona con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Es importante estandarizar las condiciones de reacción ya que la SOD compite con el sistema de detección por el $O_2^{\cdot-}$ (Mc Cord y Fridovich, 1969; Fridovich, 1984). La reacción catalizada en ambos casos es la siguiente (reacción 21):



En este método de ensayo, se genera $O_2^{\cdot-}$ y se lo hace reaccionar con una molécula detectora (adrenalina), produciéndose un cambio observable espectrofotométricamente (adrenocromo, color rosa). La SOD inhibe esa reacción por remoción del $O_2^{\cdot-}$. (Misra y Fridovich, 1972).

Las determinaciones de actividad enzimática se realizaron en los extractos eritrocitarios y en los homogenatos de las muestras de distintos tejidos ya descritos anteriormente. En la cubeta del espectrofotómetro se colocaron 2,95 mL de solución amortiguadora (glicina 50 mM, llevada a pH 10,2, con NaOH), 50 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), alcanzándose una concentración final de 1 mM. Se agitó y se leyó a 480 nm ($\epsilon_{480} = 4,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Esta reacción desarrolla color en pocos minutos, dependiendo de la temperatura (parte a del gráfico, Figura 5). Luego se agregaron diferentes volúmenes de las muestras (extractos u homogenatos) y se midió la inhibición de la reacción (parte b, Figura 5). La actividad enzimática se expresó en unidades SOD (cantidad de SOD que produce un 50 % de inhibición). Para el adrenocromo: 1 unidad = 0,15 μ g/mL de SOD = 4 nM de SOD (Figura 5).

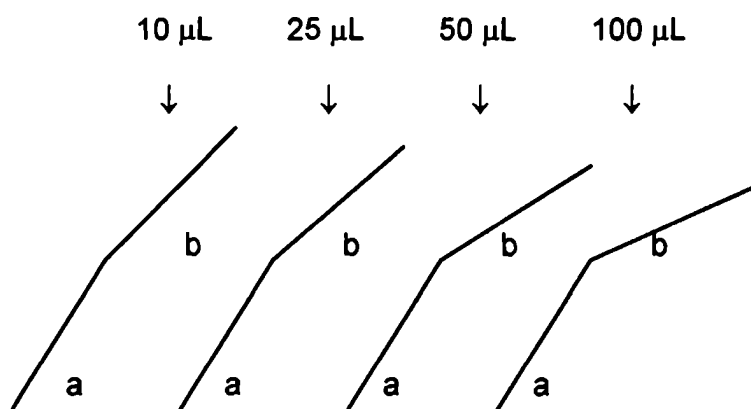


Figura 5. Determinación de la actividad de SOD.

Se tomaron las pendientes a y b ; el cociente b/a indica la fracción de actividad a esa concentración de superóxido dismutasa. Se graficó $\log b/a$ en función de los μL de muestra agregados (aquí se utilizó papel semilogarítmico). La cantidad de μL a la cual la relación $b/a = 0,5$ es la que corresponde a una unidad de superóxido dismutasa (Figura 6). Los resultados se expresaron en U/mg de proteínas (Misra y Fridovich, 1972).

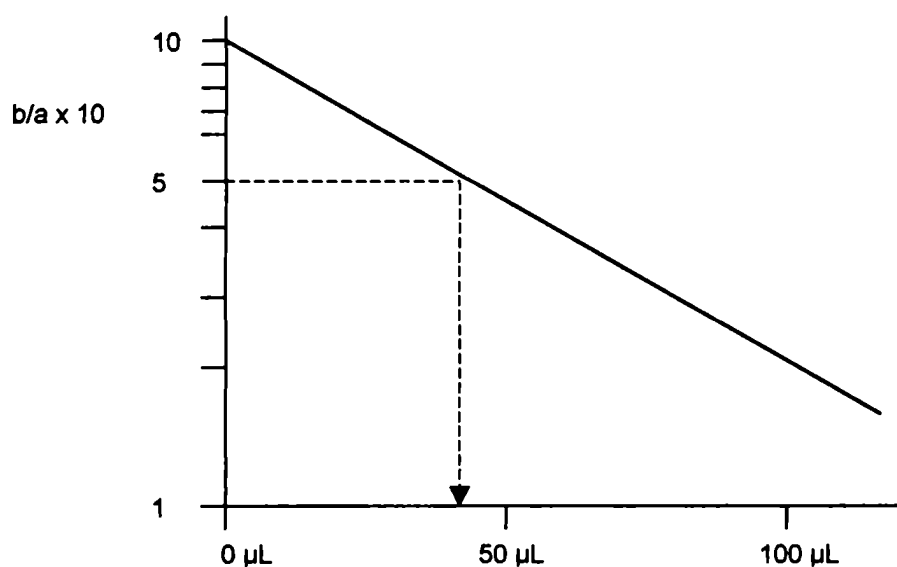
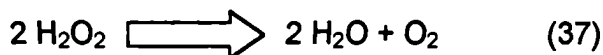


Figura 6. Representación gráfica de los valores obtenidos en la Figura 2. La línea punteada indica el volumen de muestra que contiene 1 unidad de SOD.

Actividad de catalasa

La enzima catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción (37):



La velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno es directamente proporcional a la actividad enzimática y obedece a una cinética de pseudoprimer orden con respecto al peróxido de hidrógeno (ecuaciones 38 y 39).

$$\frac{-d [\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = \boxed{k [\text{catalasa}]} \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] = k' \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (38)$$

↓
k'

en su forma integrada

$$k' = t^{-1} \cdot \ln \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_0}{[\text{H}_2\text{O}_2]_t} \quad (39)$$

Donde $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ es la concentración de peróxido de hidrógeno inicial. y $[\text{H}_2\text{O}_2]_t$ es la concentración al tiempo estudiado.

El valor de k (constante específica de reacción) es de $4,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y fue calculado considerando que la molécula posee cuatro grupos hemo. El ensayo desarrollado por Chance (1954), consiste en medir la disminución de la absorción a 240 nm (longitud de onda a la que absorbe el peróxido de hidrógeno). La medida espectrofotométrica consiste en colocar en las cubetas el medio de reacción (solución reguladora fosfato 30 mM) con diferentes alícuotas de las muestras obtenidas según lo descrito anteriormente. Se grafica una línea de base. Luego se agregan 10 μL de H_2O_2 300 mM, llegándose a una $[\text{H}_2\text{O}_2]$ de 2 mM (tiempo cero). Para el cálculo de la constante de pseudoprimer orden (k') se toma

la velocidad inicial de reacción ($\epsilon_{240 \text{ nm}} = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentración se expresó en nmoles/ mg de proteína. En la Figura 7 se muestra una gráfica típica.

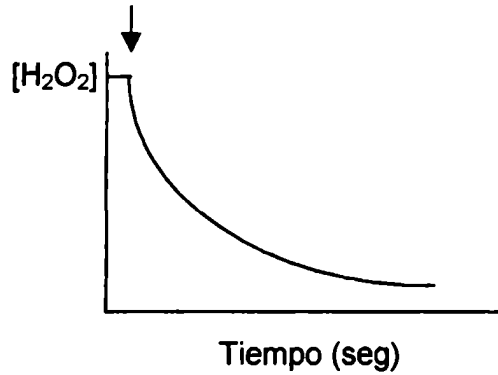
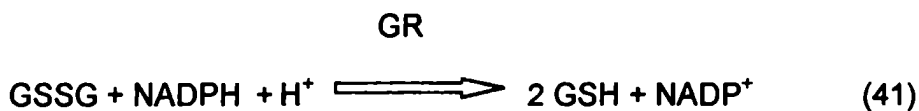
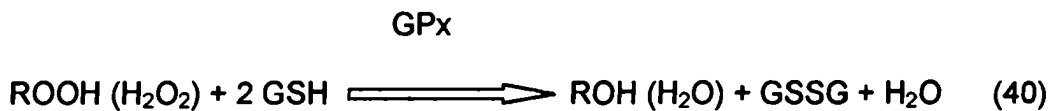


Figura 7. Determinación de Catalasa. Se muestra la variación de la velocidad de desaparición del H_2O_2 con el agregado de la muestra (flecha roja).

Actividad de glutatión peroxidasa

Esta enzima cataliza la reacción de los hidroperóxidos y la reducción del H_2O_2 , utilizando al glutatión (GSH) como dador de hidrógeno (reacción 40), para formar glutatión oxidado (GSSG) y un producto de la reducción de hidroperóxido. Fisiológicamente actúa acoplada a la enzima glutatión reductasa que a su vez cataliza la reducción de GSSG utilizando NADPH como cofactor.



La actividad de la GPx se puede estudiar midiendo la velocidad de desaparición de NADPH en un sistema que contenga GSH y en presencia de glutatión reductasa (reacción 41).

En la cubeta se colocaron 245 μL de solución reguladora de fosfatos de sodio y potasio (100 mM, pH 7,7), con GSH 100 mM, NADPH (10 mM), BOOH (*tert*-butilo, 10 mM), glutatión reductasa (10 U/mL). El GSH y el *tert*-butilo son los sustratos de la enzima, mientras que el NADPH y la glutatión reductasa garantizan un continuo suministro de glutatión reducido. Se dejó leer durante 1 minuto, graficándose una línea de base (parte a, Figura 8) y luego se agregó 100 μL de los homogenatos (flecha roja, parte b, Figura 8).

Se tomó la diferencia entre las velocidades b y a. Las muestras se leyeron a 340 nm ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad se expresó en $\mu\text{moles de NADPH/ min/ mg de proteína}$ (Flohé and Gunzler, 1984).

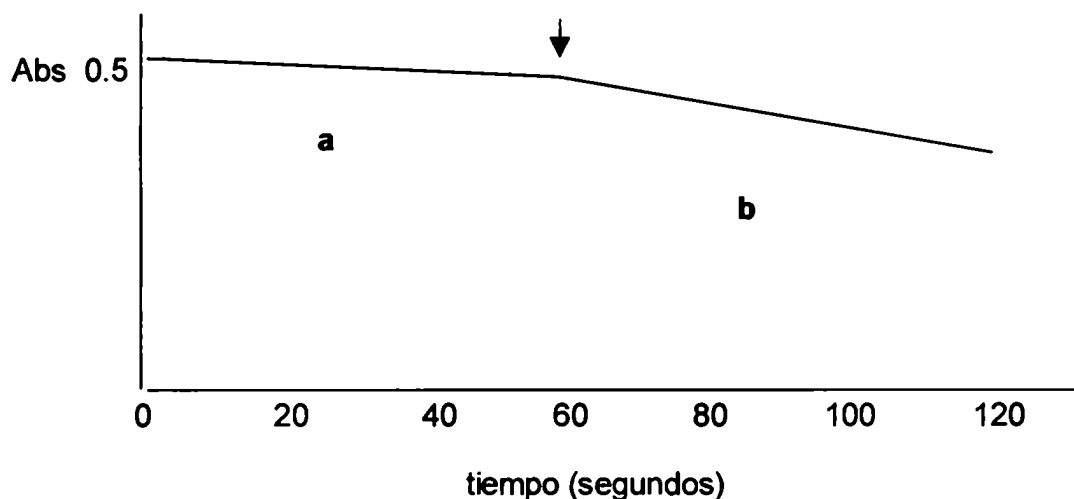


Figura 8. Representación gráfica de las curvas obtenidas en la medición de GPx. Se muestra la variación de la velocidad de consumo del NADPH con el agregado de la muestra (flecha roja).

Capacidad antioxidante total (TRAP)

Fundamento

El daño causado por radicales libres a un tejido, tanto como la degradación de moléculas biológicas, es proporcional a la concentración en el estado estacionario de los radicales libres en el sitio donde se produjo el evento. La concentración en el estado estacionario de los radicales libres ($[R]_{ee}$) está, generalmente, determinada por reacciones químicas o procesos de difusión, de manera tal que:

$$[R]_{ee} = R_p/k \quad (42)$$

donde R_p es la tasa de incorporación de radicales libres en el volumen considerado (tanto en procesos químicos o de difusión) y k es la constante de pseudoprimer orden en todos los procesos que comprenden la remoción del radical.

Los organismos aeróbicos han desarrollado una serie de estrategias tendientes a disminuir R_p (mediante antioxidantes preventivos) ó para incrementar k (mediante atrapadores de radicales libres), y, de esta manera, controlar la concentración en estado estacionario de las especies radicales y el daño asociado a ella.

En presencia de un antioxidante muy eficiente, los procesos que involucran a radicales libres podrían tener lugar una vez que el antioxidante se consuma "totalmente". En otras palabras, el valor de k en presencia del atrapador es tan alto que la concentración en el estado estacionario de los radicales libres resulta muy baja (ecuación 42) y la tasa de desarrollo de los procesos observados, mediados por estas especies, será despreciable. En presencia del atrapador, el proceso presenta un tiempo de inducción. El tiempo de inducción (t), es el tiempo requerido para consumir todos los antioxidantes. Si se asume que todos los radicales son

atrapados y que un antioxidante dado $(XH)_i$ es capaz de atrapar n_i radicales, entonces:

$$t_i = \sum n_i [XH]_i / R_p \quad (43)$$

La capacidad antioxidante total de la muestra (TRAP) (Wayner y otros, 1986) es la concentración de radicales libres que pueden ser atrapados en la muestra. La relación expresada en la ecuación anterior (43) implica que:

$$TRAP = \sum n_i [XH]_i = t_{\text{muestra}} R_p \quad (44)$$

y que su valor puede ser calculado a partir de la medición del tiempo de inducción si se conoce la tasa de producción del radical. Un procedimiento alternativo involucra el uso de un inhibidor de referencia cuyo comportamiento es conocido. Generalmente se utiliza como inhibidor de referencia un compuesto hidrosoluble denominado Trolox, de características estructurales similares a las de la vitamina E. El tiempo de inducción producido por la adición de Trolox está dado por:

$$t_{\text{Trolox}} = n_{\text{Trolox}} [\text{Trolox}] / R_p \quad (45)$$

donde n_{Trolox} es el número de radicales libres atrapados por cada molécula de Trolox consumida. Si (t') es el tiempo de inducción producto de una concentración de Trolox $1 \mu\text{M}$, el TRAP de la muestra puede ser determinado por la medida del tiempo de inducción (t) producto de una alícuota (unos pocos microlitros) del fluido y aquel (t') obtenido empleando concentraciones conocidas del inhibidor de referencia

$$TRAP (\mu\text{M}) = f n_{\text{Trolox}} t / t' \quad (46)$$

donde (f) es el factor de dilución, que es igual a la razón entre el volumen de la muestra y el volumen de la alícuota del fluido empleado para la evaluación de t .

El TRAP, así obtenido, es la medida del contenido total de antioxidantes presente en el fluido. En fluidos complejos es casi imposible medir con certeza si los resultados comprenden a todos los antioxidantes relevantes presentes.

La técnica de TRAP ha sido desarrollada principalmente para detectar la capacidad de todos los antioxidantes hidrosolubles (bilirubina, ácido ascórbico, ácido úrico, carotenoides, etc) presentes en las muestras a analizar.

Método de medición

La determinación de la capacidad antioxidante total consiste en medir la capacidad atrapadora de radicales de una muestra en un sistema que está formado por el 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (también conocido como ABAP) y el luminol. El sistema ABAP-luminol genera una emisión de luz constante, que puede medirse en un contador de centelleo (con el circuito de coincidencia desconectado) o en un luminómetro. Al agregar una muestra que contiene antioxidantes, la quimioluminiscencia disminuye hasta niveles basales. Cuando los antioxidantes presentes en la muestra se consumen, la emisión retorna a los valores de luminiscencia originales. El tiempo que tarda en retornar a la emisión original (tiempo de inducción, t_i) es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra. Para la medida se determinó, como primer paso, la luminiscencia del sistema ABAP-luminol. Luego de obtener una lectura constante, se agregó una determinada cantidad de muestra (homogeneizado de tejido). Se determinó el tiempo de inducción t_i para cada muestra. La curva de calibración se realizó con Trolox (compuesto hidrosoluble análogo de la vitamina E) en una concentración 150 mM. Esta sustancia tiene una capacidad atrapadora de radicales libres muy alta en este sistema y por ello se la utiliza como estándar o patrón. Los resultados están expresados en unidades de Trolox. Definiéndose esta unidad como la cantidad de antioxidante equivalente a 1 μ M de Trolox (Lissi et al, 1992).

Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó por el método de Lowry y otros (1951), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Determinación del contenido de antioxidantes liposolubles

El contenido de antioxidantes liposolubles de un tejido o fluido biológico fue determinado en extractos lipídicos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con una columna de fase reversa acoplada a un detector electroquímico (Buttriss y Diplock, 1984).

Preparación de los extractos para HPLC

Los extractos fueron preparados a partir de los homogenatos de tejidos de peces antárticos usando una modificación del procedimiento descrito por Buttriss y Diplock (1984). Para ello, 1 mL de homogeneizado fue tratado con 2 mL de etanol y 4 mL de hexano. La mezcla fue agitada en vortex durante 1 minuto y luego se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos con el fin de separar las distintas fases. Se transfirieron 3 mL de la fase superior (hexano) a otro tubo, donde se procedió a evaporar bajo atmósfera de nitrógeno hasta residuo seco. Luego se resuspendió dicho residuo en 0,5 mL de una mezcla metanol-agua (1:1) y se filtró a través de una membrana de 0,22 μm de poro.

Finalmente, el pico correspondiente a la vitamina E presente en los extractos fue identificado en el cromatograma comparando sus tiempos de retención con el tiempo de retención del patrón en la columna, en las mismas condiciones de corrida. La solución del patrón utilizado como estándar se encontraba en un rango 10-15 μM . La cantidad de vitamina E se calculó comparando el área correspondiente a cada muestra con el área de una cantidad conocida de estándar. Los resultados están expresados en nmoles/ g de tejido.

Características del equipo de HPLC y condiciones de trabajo

El equipo de HPLC utilizado constaba de: una válvula de inyección (BAS) conectada a una columna Supelcosil LC-8 DB (3,3 cm x 4,6 mm) de 3 µm de diámetro interno, que poseía una pre-columna de LC-8 DB. Una bomba de HPLC Waters 510 daba la velocidad de flujo de la fase móvil. Para la medición de antioxidantes liposolubles, los sistemas de detección utilizados fueron el detector de absorbancia UV-Vis Waters 486 y el detector electroquímico BAS LC-4C. El sistema de detección estaba conectado a una computadora Macintosh SE/30 donde aparecía el registro del cromatograma de la corrida con los picos y áreas correspondientes. La integración de las áreas la realizó el programa de computación Dynamax HPLC Method Manager.

La fase móvil utilizada fue metanol-agua (9:1) con el agregado de LiClO₄ 20 mM. La velocidad de flujo fue de 1 mL/ min. y, en estas condiciones, el tiempo de retención para la vitamina E (α-tocoferol) fue de 0,8. El detector electroquímico fue fijado a un potencial de oxidación +0,6 V.

Preparaciones histológicas

Las muestras de tejido branquial se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes (de 80° a 100°) y posteriormente se incluyeron en Paraplast. Una vez solidificado, se tallaron los tacos y se realizaron cortes longitudinales (siguiendo el eje mayor de las branquias) de 5 a 7 µm de espesor.

La técnica de coloración empleada para teñir los cortes fue Tricrómico de Masson (modificado por De Carlo). Los pasos se detallan a continuación:

Los cortes se desparafinan por inmersión en xilol durante 5 minutos. Luego se hidratan pasando por una serie decreciente de alcoholes (de 100° a 50°), finalizando con agua destilada. Se sumergen durante 10 minutos en Hematoxilina de Carazzi, Erlich, Delafield o Mayer. Transcurrido este lapso de tiempo se lavan los cortes con agua común para que vire su coloración a color violeta. Se sumergen entonces durante 5 minutos en fucsina ácida punceau de xilidina. Luego se lava con agua destilada. Inmediatamente después se sumergen durante otros 5

minutos en ácido fosfomolibdico al 1% (agente que actúa como diferenciador y mordiente). Sin lavar, se colorean con azul de anilina acética de 2 a 5 minutos, y se lavan con agua destilada. Luego se sumergen durante 15 minutos en agua acética al 1% (que también actúa como diferenciador de colores). Por último se deshidrata pasando por una serie creciente de alcoholes (de 80° a 100°), se lava con xilol y se monta el cubreobjeto con DPX.

Si hay sobre coloración con hematoxilina, se trata el corte con alcohol clorhídrico hasta que se ponga rojo y luego se agrega al agua corriente una gota de carbonato de litio para obtener un viraje azulado.

Resultados de la tinción

A través del empleo de esta técnica es posible diferenciar por su tinción específica: los núcleos de color violeta; los citoplasmas de color rojo vivo; las fibras colágenas de color azul intenso; el cartílago, el mucus y la matriz de color azul claro.

Cálculo de las distancias de difusión

Los preparados fueron analizados con un microscopio Zeiss Axioplan, provisto de ocular micrométrico para el cálculo de las distancias. Las distancias de difusión fueron medidas tomando la longitud del espacio comprendido entre la sangre y el borde del epitelio en contacto con el agua. De esta manera se trabajó desde el origen de la laminilla secundaria hasta el extremo terminal, midiendo hacia ambos lados. Todas las distancias fueron tomadas a un aumento de 1000X.

Con una cámara adosada al microscopio ya descrito, se tomaron fotos de los distintos cortes variando los aumentos.

Métodos estadísticos

Las diferencias entre distintos grupos fueron evaluadas por medio del análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y el test de Tukey para la

Materiales y métodos

comparación entre los valores promedio de los diferentes grupos de estudio. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de p fue menor que 0,05.

1) Actividad de las enzimas antioxidantesSuperóxido dismutasa (SOD)

Como se aprecia en la Figura 9, si comparamos la actividad de SOD presente en las muestras de sangre de los peces de ambas familias, se observa una diferencia altamente significativa, siendo la actividad presente en los glóbulos rojos de los nototénidos siempre mayor que en la sangre de los caníctidos. No se observan diferencias significativas entre especies de la misma familia.

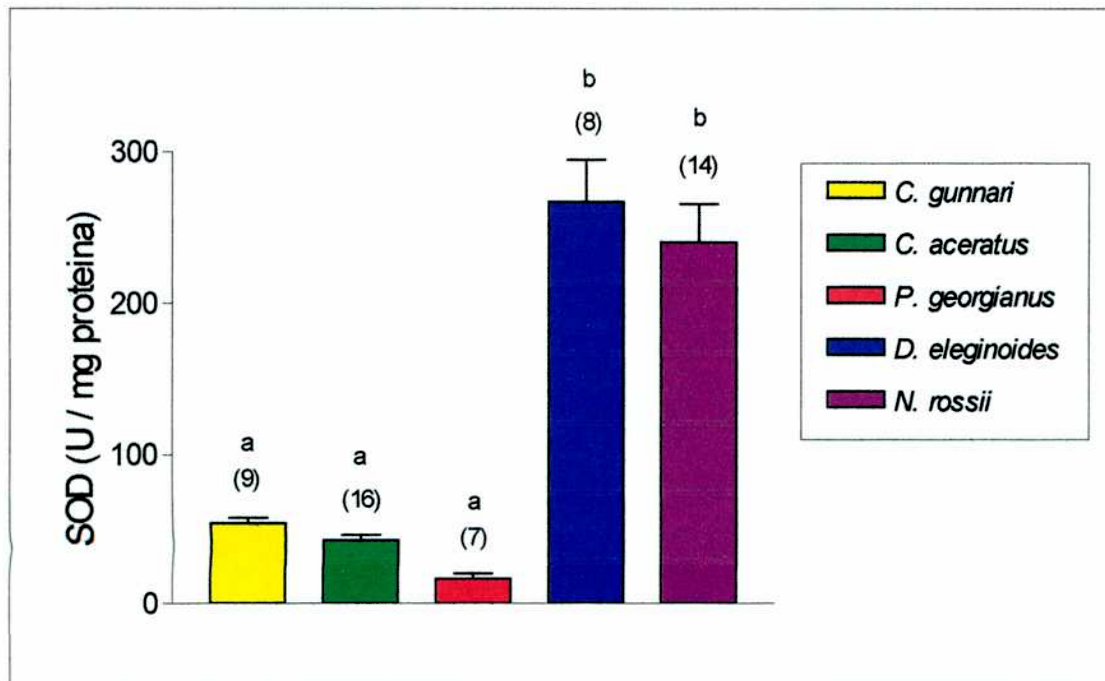


Figura 9. Actividad de SOD en las muestras de sangre de los peces antárticos estudiados. Los valores corresponden a las medias \pm E.S.; el número de animales está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.001$.

La actividad de la SOD branquial es notoriamente diferente a la de los demás tejidos analizados. Las branquias de los peces de hielo (*C. gunnari*, *C. aceratus* y *P. georgianus*) muestran una actividad 3 veces mayor que las registradas en las branquias de los nototénidos (*D. eleginoides* y *N. rossii*) (Figura 10). No hay diferencias significativas dentro de cada familia.

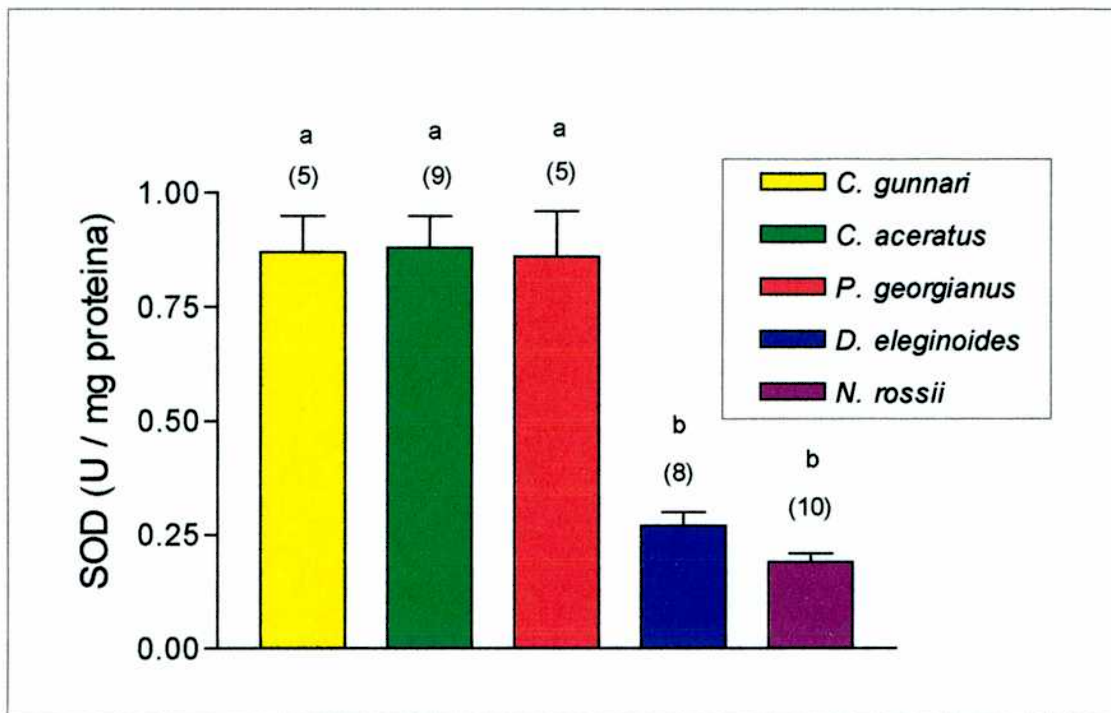


Figura 10. Actividad de SOD en las branquias de los peces antárticos estudiados. Los valores corresponden a las medias \pm E.S.; el número de animales está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.05$.

Las comparaciones entre especies para distintos tejidos indican que ni en músculo ni en hígado existen diferencias significativas entre las especies. Solo el corazón de *N. rossii* mostró una actividad de SOD significativamente más alta en comparación con el mismo tejido de las otras especies estudiadas (Tabla 1).

Tabla 1: Actividad de superóxido dismutasa en hígado, músculo y corazón de peces antárticos.

| Especie | SOD (U / mg de proteína) | | |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | Hígado | Músculo | Corazón |
| <i>Champscephalus gunnari</i> | 0.75 ± 0.06 (14) | 0.87 ± 0.08 (10) | 0.85 ± 0.06 ^a (11) |
| <i>Chaenocephalus aceratus</i> | 0.96 ± 0.10 (16) | 1.02 ± 0.12 (6) | 1.05 ± 0.06 ^a (12) |
| <i>Pseudochaenichthys georgianus</i> | 0.69 ± 0.06 (11) | 0.78 ± 0.07 (8) | 1.05 ± 0.02 ^a (9) |
| <i>Dissostichus eleginoides</i> | 1.08 ± 0.16 (10) | 1.00 ± 0.19 (7) | 0.89 ± 0.05 ^a (9) |
| <i>Notothenia rossii</i> | 0.91 ± 0.06 (16) | 0.70 ± 0.05 (13) | 1.39 ± 0.11 ^b (10) |

Los valores corresponden a las medias ± E.S.; el número de animales está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.05$.

Catalasa (CAT)

Tanto en las muestras provenientes de los caníctidos como de los nototénidos, la actividad de catalasa presentó una distribución similar entre los tejidos examinados, con los valores más altos registrados en hígado. Sin embargo, el nivel de actividad, en el conjunto de todos los tejidos analizados, fue marcadamente más bajo en los peces de hielo. El nivel de actividad de CAT registrado en el hígado de los nototénidos fue 3 a 4 veces más alto que en los caníctidos. De manera similar la actividad de CAT fue más alta en nototénidos que en los peces de hielo, 3 a 12 veces en branquias y 3 a 4 veces en corazón. En todas las especies analizadas el músculo fue el tejido con la menor actividad registrada y fue el único que no mostró diferencias entre familias (Tabla 2).

Tabla 2: Actividad de catalasa en hígado, branquias, músculo y corazón de peces antárticos.

| Especies | CAT (pmoles / mg de proteína) | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| | Hígado | Branquias | Músculo | Corazón |
| <i>Champsocephalus gunnari</i> | 0.98 ± 0.13 ^a (15) | 0.065 ± 0.006 ^a (8) | 0.039 ± 0.006 ^{ab} (8) | 0.12 ± 0.02 ^a (11) |
| <i>Chaenocephalus aceratus</i> | 0.47 ± 0.08 ^a (15) | 0.048 ± 0.004 ^a (8) | 0.011 ± 0.001 ^a (4) | 0.07 ± 0.01 ^a (14) |
| <i>Pseudochaenichthys georgianus</i> | 0.84 ± 0.08 ^a (14) | 0.058 ± 0.009 ^a (9) | 0.036 ± 0.004 ^{ab} (5) | 0.09 ± 0.01 ^a (8) |
| <i>Dissostichus eleginoides</i> | 4.47 ± 0.45 ^b (9) | 0.276 ± 0.028 ^b (7) | 0.031 ± 0.005 ^a (7) | 0.34 ± 0.03 ^b (9) |
| <i>Notothenia rossii</i> | 3.23 ± 0.31 ^c (12) | 0.697 ± 0.035 ^c (10) | 0.060 ± 0.010 ^b (9) | 0.38 ± 0.03 ^b (13) |

Los valores corresponden a las medias ± E.S.; el número de animales está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.05$.

Glutación peroxidasa (GPx)

En los caníctidos los niveles de actividad de GPx observados en el hígado y en el corazón fueron 4 a 6 veces mayores que aquellos registrados en branquias y músculo. En los nototénidos, el nivel de actividad más bajo de esta enzima fue registrado en músculo.

La comparación entre ambas familias sólo arrojó diferencias significativas en branquias, siendo la actividad de GPx 2.5 a 3 veces mayor los nototénidos (Tabla 3).

Tabla 3: Actividad de glutatión peroxidasa en hígado, branquias, músculo y corazón de peces antárticos.

| Especies | GPx (µmoles NADPH/ min. mg de proteína) | | | |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Hígado | Branquias | Músculo | Corazón |
| <i>Champscephalus gunnari</i> | 4.84 ± 0.71 (13) | 0.94 ± 0.09 ^a (5) | 0.94 ± 0.17 (9) | 6.88 ± 0.58 (6) |
| <i>Chaenocephalus aceratus</i> | 6.03 ± 0.48 (12) | 1.06 ± 0.37 ^a (5) | 1.82 ± 0.27 (6) | 5.73 ± 0.53 (6) |
| <i>Pseudochaenichthys georgianus</i> | 3.15 ± 0.54 (6) | 1.15 ± 0.16 ^a (5) | 1.75 ± 0.43 (6) | 6.38 ± 0.90 (5) |
| <i>Dissostichus eleginoides</i> | 4.76 ± 0.64 (8) | 3.04 ± 0.79 ^b (6) | 1.08 ± 0.18 (6) | 8.47 ± 0.69 (6) |
| <i>Notothenia rossii</i> | 7.16 ± 0.1.4 (15) | 3.05 ± 0.46 ^b (8) | 0.99 ± 0.14 (12) | 6.94 ± 0.71 (10) |

Los valores corresponden a las medias ± E.S.; el número de animales está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.05$.

2) Niveles de vitamina E

La vitamina E mostró significativas diferencias dentro de una misma familia, especialmente en los nototénidos. En *N. rossii* el contenido de esta vitamina fue de 8 a 33 veces mayor en corazón e hígado, respectivamente, comparando con aquellos observados en similares tejidos de *D. eleginoides*. No hubo diferencias detectables entre los niveles de vitamina E presentes en el músculo de estas dos especies. En los caníctidos tampoco se encontraron diferencias significativas para hígado y músculo. La única diferencia se observó en corazón de *P. georgianus* cuyo nivel de vitamina E fue menor que el registrado en el corazón de las otras especies de peces de hielo.

Salvo en el hígado de *N. rossii*, donde la vitamina E registró el valor más alto, los niveles de esta vitamina siempre fueron más altos en caníctidos que en nototénidos (Tabla 4).

Tabla 4: Niveles de vitamina E en hígado, músculo y corazón de peces antárticos.

| Especies | Vitamin E (nmoles/ mg de proteína) | | |
|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Hígado | Músculo | Corazón |
| <i>Champscephalus gunnari</i> | 126 ± 23 ^{ab} (8) | 94 ± 11 ^a (8) | 174 ± 22 ^a (4) |
| <i>Chaenocephalus aceratus</i> | 142 ± 21 ^{ab} (9) | 107 ± 12 ^a (6) | 178 ± 27 ^a (6) |
| <i>Pseudochaenichthys georgianus</i> | 242 ± 49 ^a (6) | 138 ± 22 ^a (7) | 75 ± 14 ^b (6) |
| <i>Dissostichus eleginoides</i> | 29 ± 7 ^b (4) | 45 ± 11 ^b (7) | 12 ± 2 ^c (6) |
| <i>Notothenia rossii</i> | 969 ± 56 ^c (6) | 32 ± 6 ^b (5) | 86 ± 19 ^b (6) |

Los valores corresponden a las medias ± E.S.; el número de animales está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.05$.

3) Capacidad antioxidante total (TRAP)

La medición del TRAP en hígado y corazón fue notoriamente diferente entre las dos especies de nototénidos. Aunque ambas especies mostraron una mayor capacidad en hígado que en corazón, *N. rossii* siempre tuvo los niveles más altos. En las muestras de músculo de estas especies dicha variable no

mostró valores detectables. En los peces de hielo el TRAP fue más alto en hígado que en los otros tejidos, siendo el músculo el que registró el valor más bajo (Tabla 5).

La capacidad antioxidante total mostró valores similares entre todas las especies estudiadas, exceptuando a *N. rossii* que tuvo los registros más altos en hígado y corazón.

Tabla 5: Capacidad antioxidante total del hígado, músculo y corazón de peces antárticos.

| Especies | TRAP (μ moles de Trolox) | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| | Hígado | Músculo | Corazón |
| <i>Champscephalus gunnari</i> | 234 \pm 37 ^a (6) | 17.4 \pm 2.6 (6) | 49.5 \pm 8.6 ^a (6) |
| <i>Chaenocephalus aceratus</i> | 180 \pm 38 ^a (4) | 25.2 \pm 2.5 (4) | 42.3 \pm 4.3 ^a (4) |
| <i>Pseudochaenichthys georgianus</i> | 252 \pm 30 ^a (3) | 29.1 \pm 2.5 (3) | 49 \pm 4 ^a (3) |
| <i>Dissostichus eleginoides</i> | 193 \pm 26 ^a (4) | N.D. (4) | 48.8 \pm 5.3 ^a (4) |
| <i>Notothenia rossii</i> | 498 \pm 50 ^b (5) | N.D. (4) | 120 \pm 3.0 ^b (5) |

Los valores corresponden a las medias \pm E.S.; el número de animales está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.05$.

4) Análisis de la anatomía e histología branquial de las especies estudiadas

Anatomía

Las branquias de los peces antárticos responden al patrón de las de un teleósteo típico. Comprenden dos series de cuatro holobranquias que forman las paredes de la faringe. Cada holobranquia se compone de dos hemibranquias que se proyectan desde el borde posterior del arco branquial, de tal forma que los bordes libres divergen y tocan a los de las holobranquias adyacentes.

El examen minucioso de las hemibranquias muestra que están formadas por una fila de largos filamentos delgados, que se proyectan desde el arco a manera de dientes de un peine. El área de la superficie de estos filamentos aumenta aún más por la formación de unos repliegues semilunares dispuestos regularmente sobre toda su superficie dorsal y ventral: las laminillas secundarias.

Las laminillas secundarias, de cada filamento, están dispuestas de manera escalonada de forma tal que complementan los espacios en las líneas de las laminillas de los filamentos adyacentes (Figura 3). Esta disposición de los arcos branquiales y sus laminillas forma sobre las dos caras de la faringe un doble filtro, a través del cual el agua fluye continuamente.

Dentro de los filamentos hay vasos sanguíneos que transportan sangre desoxigenada hacia el interior de las membranas respiratorias (arterias branquiales aferentes) y otros vasos que transportan sangre muy oxigenada hacia el cuerpo (arterias branquiales eferentes). Dentro de las laminillas secundarias hay pequeñas cámaras (canales o lagunas sanguíneas) hacia donde el oxígeno difunde desde el agua que pasa por las laminillas a través de los espacios interlaminillares.

Las branquias de los peces son capaces de extraer una gran cantidad de oxígeno del agua gracias a que el flujo del agua y el de la sangre transcurren en direcciones opuestas (flujo en contracorriente)(Figura 11).

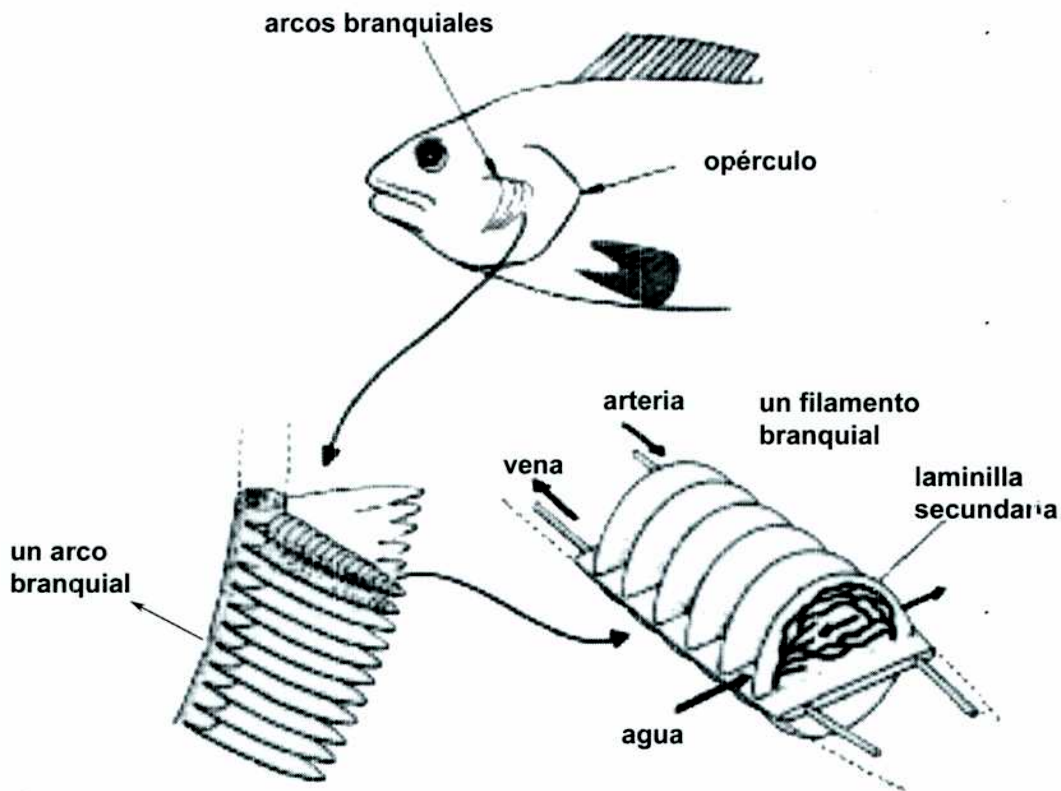


Figura 11. Las branquias de los peces están constituidas por varios arcos branquiales y cada filamento lleva unas pequeñas y delgadas laminillas paralelas y aplanadas. En estas laminillas branquiales, la sangre circula en dirección opuesta a la del agua que pasa por entre las laminillas (tomado de Schmidt-Nielsen, 1976)

Histología

En los peces antárticos, como en la mayoría de los teleósteos, el arco branquial está recubierto por un tejido epidérmico típico, mucho más grueso en el origen de la epidermis de los filamentos que está bien provista de células mucosas.

El intercambio gaseoso tiene lugar en la superficie de las laminillas secundarias que están recubiertas por un epitelio simple bien diferenciado según las familias. En los peces de hielo este epitelio presenta un borde irregular, como ondas, mientras que en los nototénidos esta característica está ausente. En

alguno de los casos, como en las laminillas de *D. eleginoides*, se puede apreciar la presencia de células mucosas en esta capa de tejido.

Por debajo, se ubica una membrana basal muy fina que lo separa de una capa de células de sostén o células pilares (contráctiles), entre las cuales se intercalan canales por los que fluye la sangre. Estos canales o lagunas no presentan células endoteliales en su perímetro, sus paredes las conforman las células en pilar, por lo que no se los considera verdaderos capilares. El extremo terminal de la laminilla secundaria sí presenta un capilar verdadero (Figura 12 y Fotos A-I).

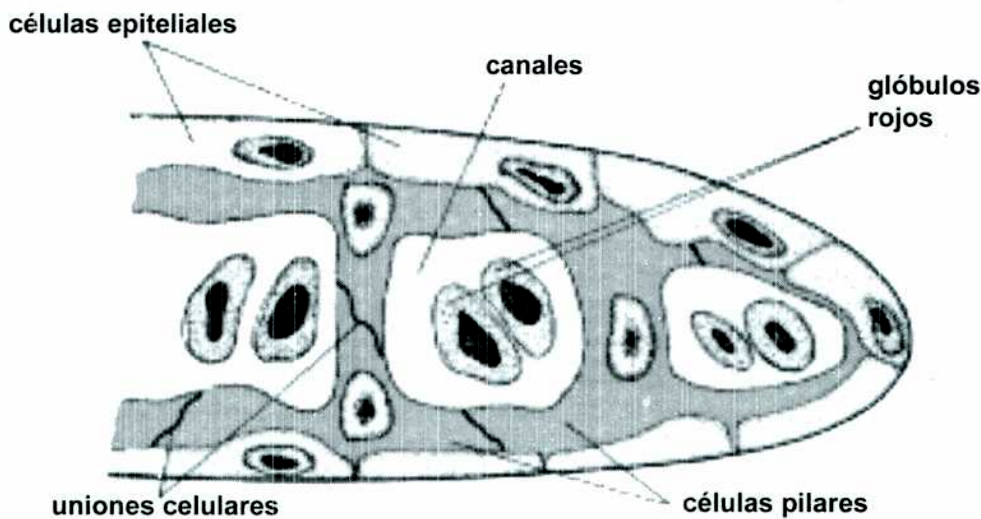


Figura 12. Esquema de los grupos celulares que componen la laminilla secundaria de una branquia.

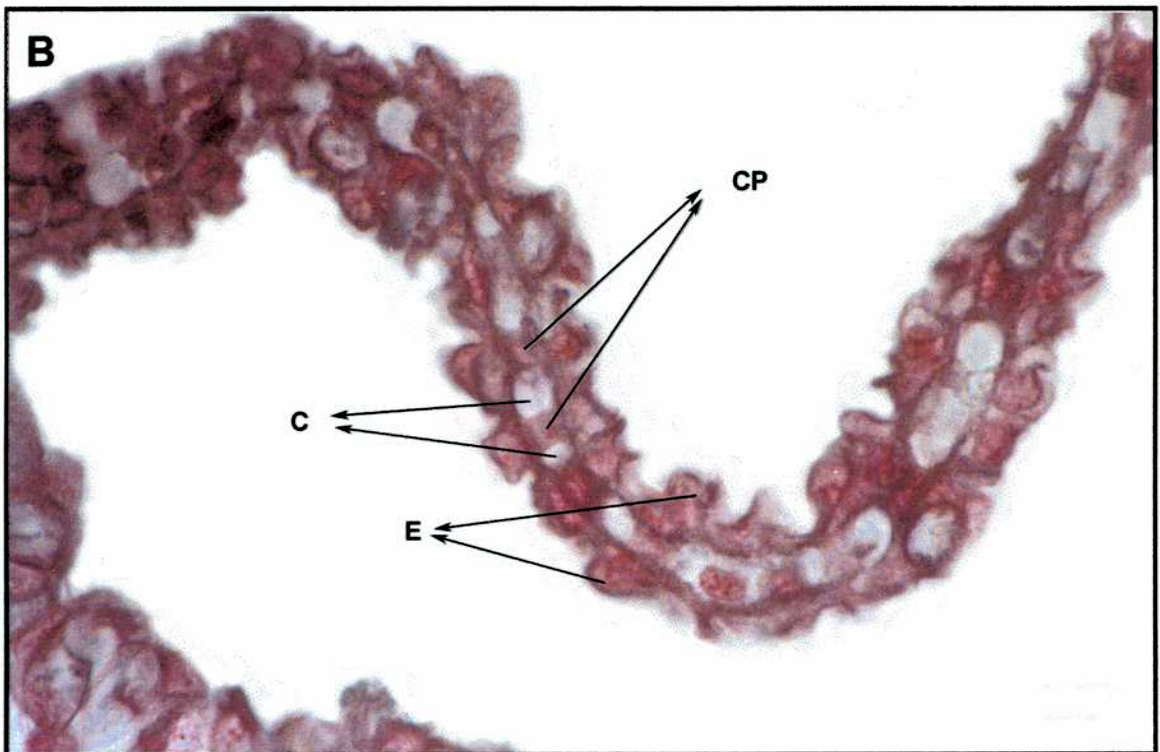
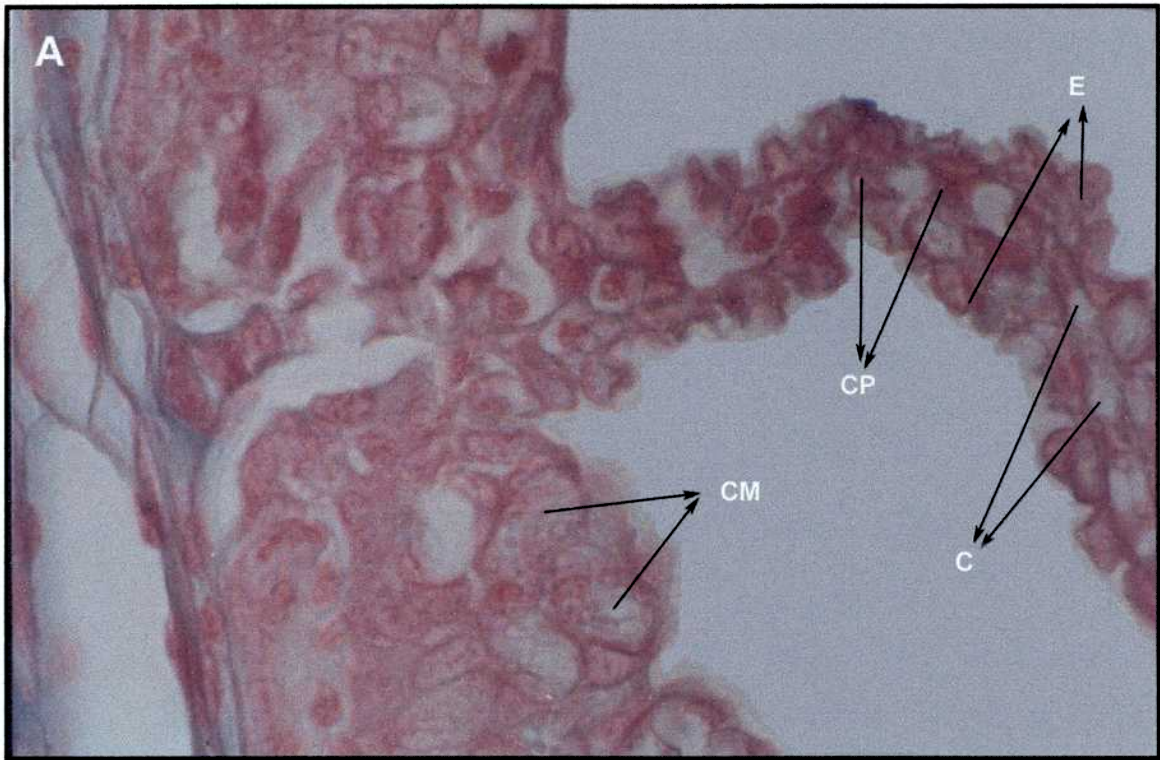
5) Distancias de difusión

Como se observa en la Tabla 6, las medidas de las distancias de difusión sangre-agua, en las laminillas secundarias de las branquias de los peces antárticos, no siguen una correlación directa con la familia a la que pertenece cada una de las especies estudiadas. Las diferencias son significativas aún dentro de cada familia.

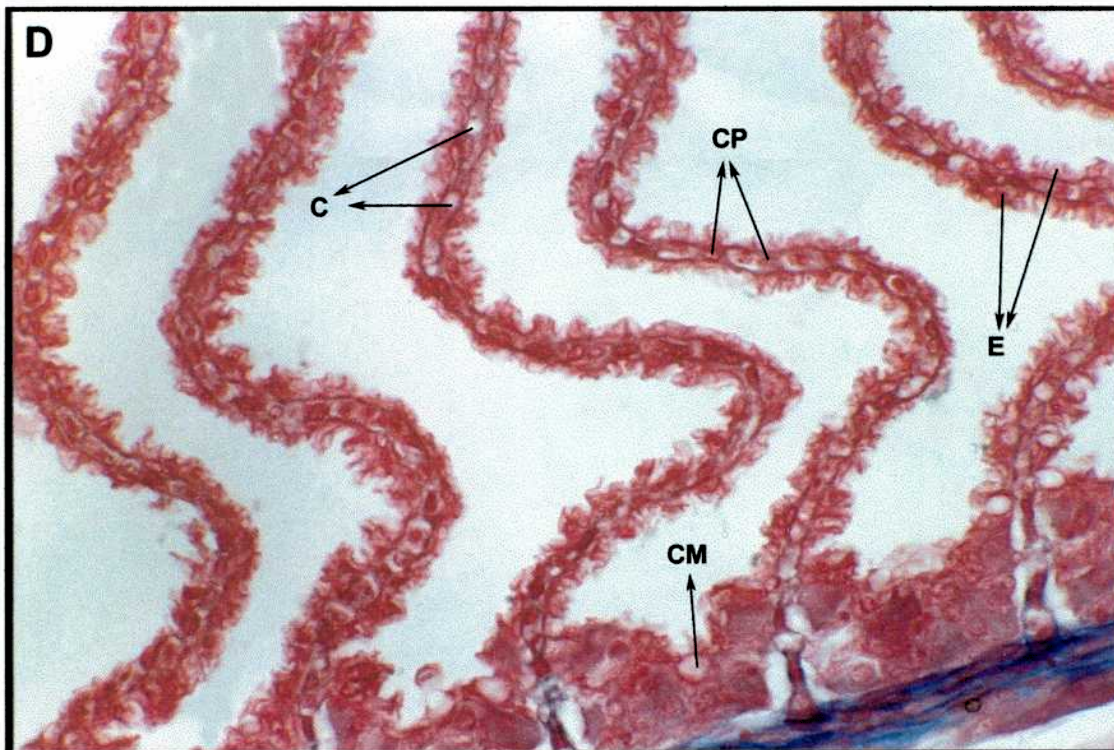
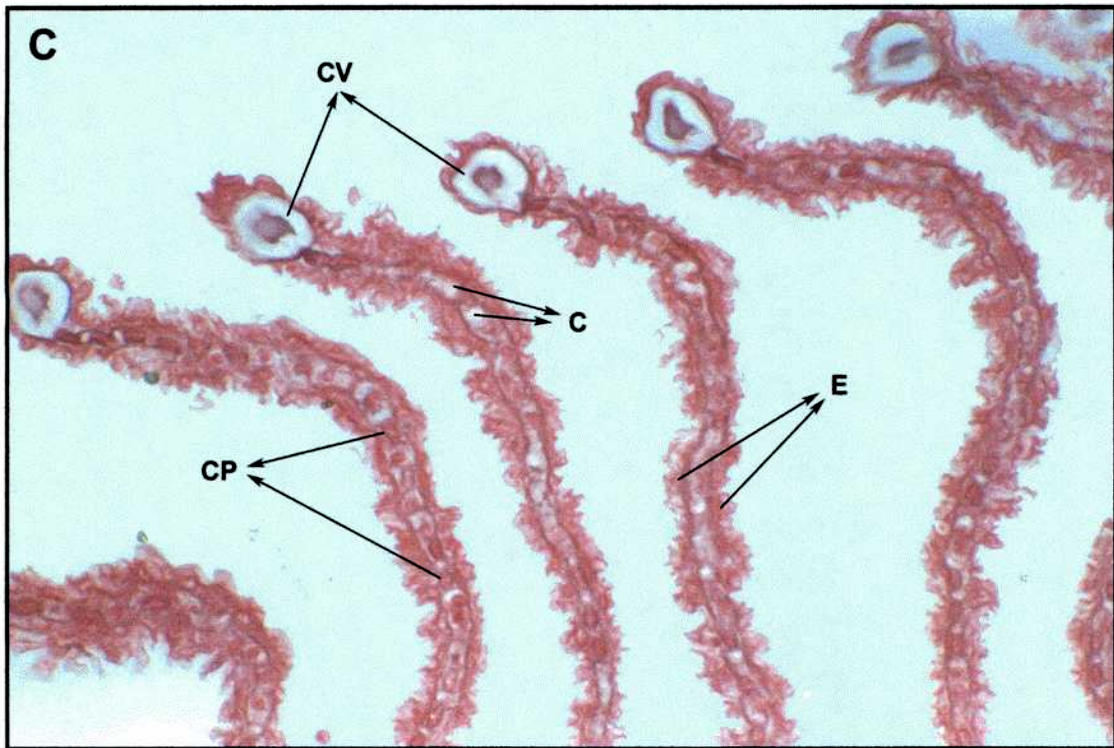
Tabla 6: Distancia de difusión sangre-agua en las laminillas secundarias de las branquias de peces antárticos.

| Especies | Distancia agua-sangre (μm) | | |
|--------------------------------------|---|--------|---------------------------|
| | Mínima | Máxima | $\bar{X} \pm \text{E.S.}$ |
| <i>Champscephalus gunnari</i> | 1.0 | 3.8 | 2.11 ± 0.12^b (48) |
| <i>Chaenocephalus aceratus</i> | – | – | 6.0^* |
| <i>Pseudochaenichthys georgianus</i> | 1.9 | 10.6 | 4.96 ± 0.32^a (48) |
| <i>Dissostichus eleginoides</i> | 1.0 | 6.7 | 3.10 ± 0.20^c (48) |
| <i>Notothernia rossii</i> | 1.9 | 8.6 | 4.72 ± 0.24^a (5) |

El número de medidas está indicado entre paréntesis. Para las comparaciones múltiples entre especies, los valores indicados con distintas letras son significativamente diferentes con $p < 0.05$. * Los valores correspondientes a *C. aceratus* fueron tomados de Steen y Berg (1966).



Fotos A y B. Laminillas secundarias de un filamento branquial de *C. gunnari* (aumento 1000X). E: epitelio. C: canales circulatorios. CP: células en pilar. CM: células mucosas.



Fotos C y D. Laminillas secundarias de un filamento branquial de *P. georgianus* (aumento 400X). E: epitelio. C: canales circulatorios. CP: células en pilar. CM: células mucosas. CV: capilares verdaderos.

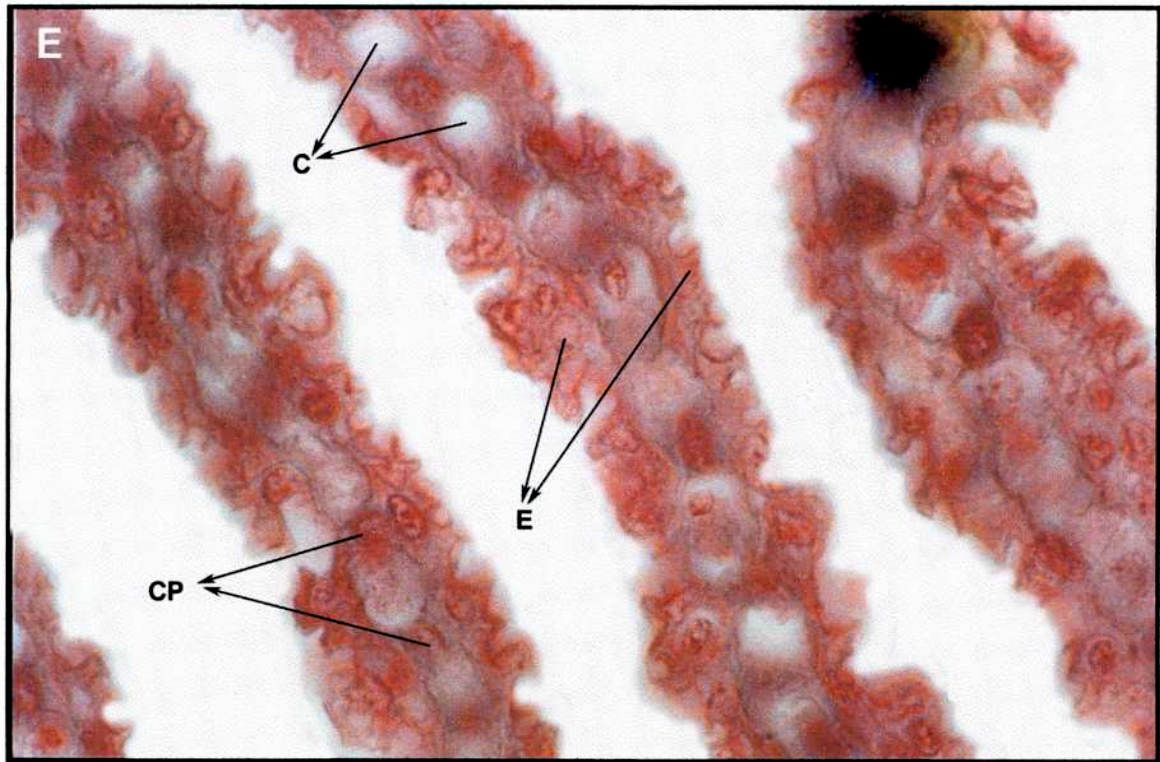
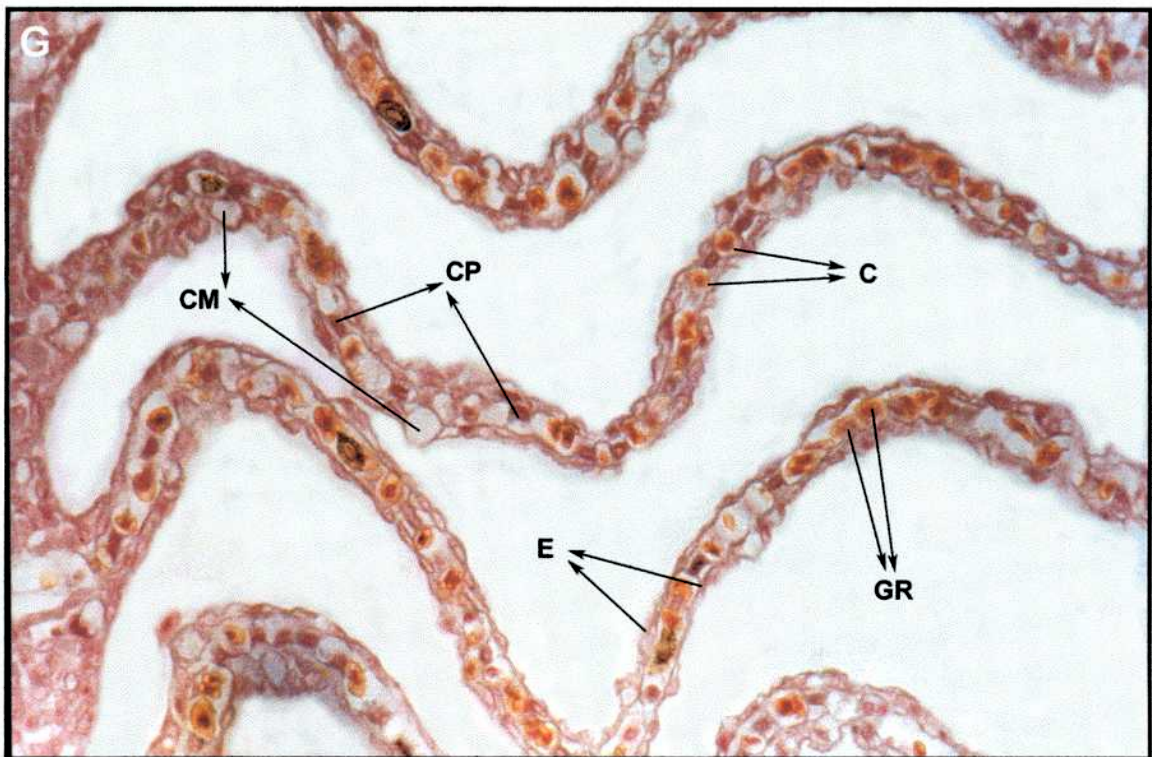
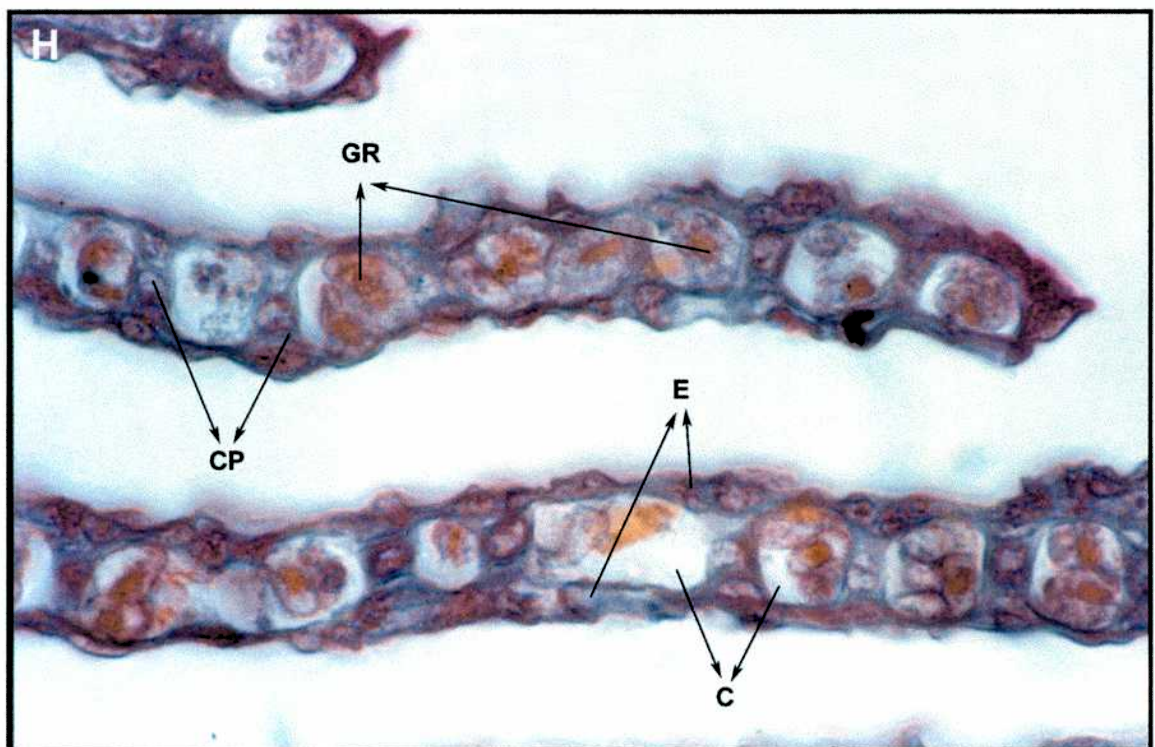


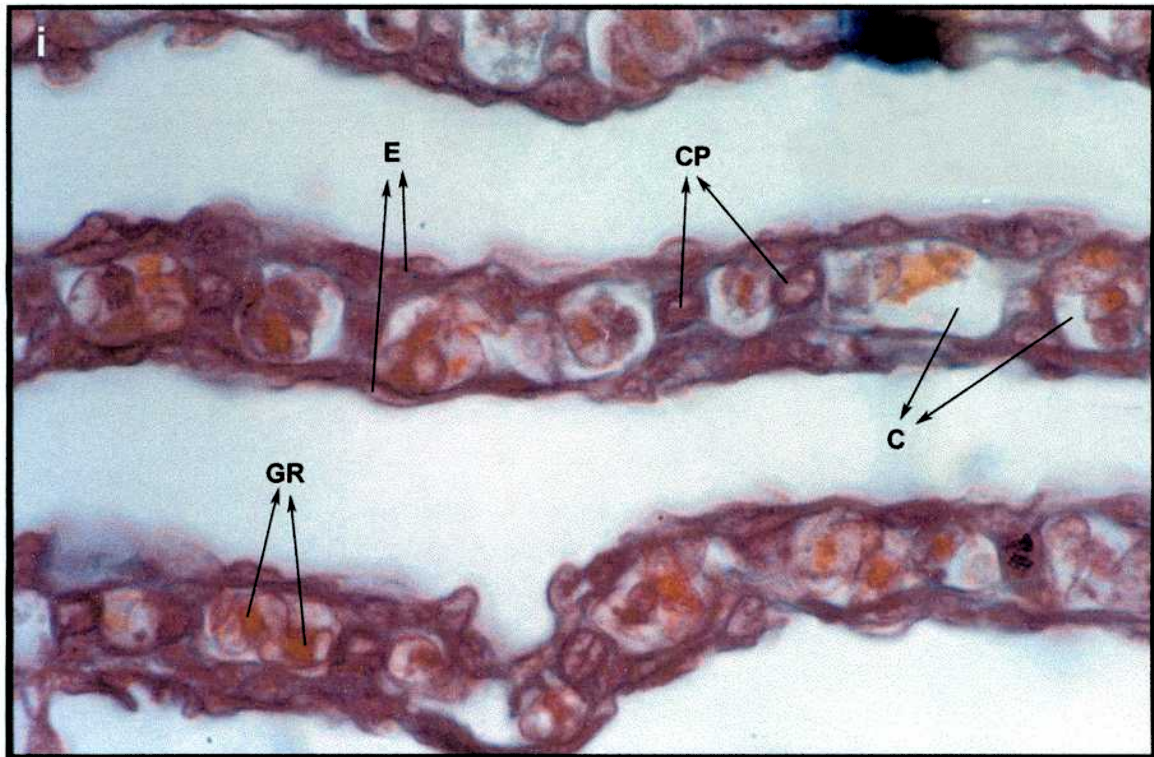
Foto E. Laminillas secundarias de un filamento branquial de *P. georgianus* (aumento 1000X). E: epitelio. C: canales circulatorios. CP: células en pilar.





Fotos F y G. Laminillas secundarias de un filamento branquial de *D. eleginoides* (aumentos F:200X y G: 400X). E: epitelio. C: canales circulatorios. CP: células en pilar. CM: células mucosas. GR: glóbulos rojos. F: filamento. CV: capilares verdaderos





Fotos H e I. Laminillas secundarias de un filamento branquial de *N. rossii* (aumento 1000X). E: epitelio. C: canales circulatorios. CP: células en pilar. GR: glóbulos rojos.

En las últimas dos décadas, el interés por la relación entre las condiciones ambientales y los mecanismos de defensa antioxidante en los organismos acuáticos ha generado numerosas publicaciones (Winston, 1991; Winston y Di Giulio, 1991). Algunas de ellas se centraron en el estudio comparado de los componentes antioxidantes de los tejidos de peces tropicales y de aguas templadas (Matkovics y otros, 1977; Fitzgerald, 1992; Wilhelm Filho y otros, 1993), pero solo unas pocas conciernen a los peces antárticos (Witas y otros, 1984; Cassini y otros, 1993). Como regla general en todos estos trabajos se comparó y confrontó la respuesta de organismos de distintas latitudes (por ejemplo, peces antárticos versus peces de aguas templadas). Este tipo de procedimiento ha generado numerosas controversias entre los ictiólogos, principalmente los fisiólogos, especializados en la fauna antártica.

Existe, hace ya muchos años, la discusión planteada acerca de cómo debe razonarse la adaptación metabólica al frío (AMF), medida a partir del consumo de oxígeno, pues de acuerdo a como se consideren las comparaciones entre los animales estudiados, los datos reflejan resultados contradictorios. Crockett y Sidell (1990) ofrecen una definición de AMF, que no está basada en el consumo de oxígeno y que pone énfasis en la actividad más que en el metabolismo basal. Consideran a la AMF como "el o los procesos que permiten a un organismo vivir de manera crónica o estacional a temperaturas heladas, manteniendo una tasa de actividad metabólica alta en comparación a un organismo del mismo ecotipo, pero de zonas templadas, expuesto de manera aguda o aclimatado a las mismas bajas temperaturas". Utilizando esta amplia definición, es posible abarcar a la AMF desde otra perspectiva, midiendo directamente los niveles de actividad bioquímica en varios órganos.

Dentro de este marco teórico-práctico, la presente Tesis Doctoral es el primer trabajo comparado, considerando la actividad de los compuestos enzimáticos y no enzimáticos que involucra a los mecanismos de defensa antioxidante, realizado en peces antárticos, que abarca cinco especies agrupadas en dos familias del mismo suborden y con distribución zoogeográfica similar, es

decir animales que viven y se desarrollan bajo las mismas condiciones ambientales.

La familia Channichthyidae, una de las 6 familias de peces antárticos del suborden Notothenioidei, es única entre los vertebrados ya que todos los miembros de dicha familia han perdido la totalidad de sus pigmentos respiratorios sanguíneos (Ruud, 1954). Un examen cuidadoso de sangre fresca o especialmente preservada revela la presencia de unas pocas células sanguíneas no pigmentadas. Aunque los "eritrocitos" de los caníctidos han perdido su hemoglobina, poseen altas concentraciones de enzimas, como la anhidrasa carbónica y la glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (Wells y otros, 1980; Ciardiello y otros, 1997).

¿Cómo se manejan los caníctidos sin hemoglobina que, en otros vertebrados, es absolutamente imprescindible para asegurar un adecuado aporte de oxígeno a los tejidos?

Las bajas temperaturas reinantes serían la base de esta respuesta pues actúan disminuyendo los requerimientos metabólicos de oxígeno e incrementando, simultáneamente, la cantidad de oxígeno que puede estar disuelto en el agua de mar y en los fluidos corporales (Macdonald y otros, 1987; Clarke y Johnston 1996; di Prisco, 1997). La sangre de los caníctidos transporta oxígeno en una solución simple, lo que implica que su capacidad de transporte corresponde a la décima parte de aquellas sangres de otros nototenoideos con hemoglobina (Holeton, 1970). La capacidad total de transporte de oxígeno se halla incrementada por el importante volumen sanguíneo, que corresponde a aproximadamente el 9 % del peso corporal, 2 a 4 veces mayor que el de otros teleósteos (Hemmingsen y Douglas, 1970; Acierno y otros 1995).

El desarrollo de las branquias es variable: en algunos peces de hielo las branquias son grandes (Ruud, 1954), mientras que en otros son de tamaño normal (Steen y Berg, 1966) o reducidas (Hughes, 1972). En todos los casos, la tasa ventilatoria de las branquias es lo suficientemente alta como para permitir un intercambio gaseoso particularmente eficiente. El intercambio gaseoso branquial

está, además, aumentado por una proporción considerable de respiración cutánea (Hemmingsen y Douglas, 1970).

La elevación de la tasa de perfusión sanguínea, en las branquias y en los tejidos, contrarresta la baja capacidad de transporte de oxígeno de la sangre para liberar suficiente oxígeno a los tejidos. Tanto las arterias branquiales aferentes como las eferentes son grandes en diámetro, con relativamente poca musculatura, favoreciendo la tasa elevada de perfusión branquial. El número de capilares que llegan a los músculos es bajo, pero su escasez se ve compensada por su gran diámetro (64 μm , tres veces mayor que el de otros teleósteos), con la consecuente disminución de la resistencia vascular. El corazón es desproporcionadamente grande, con una fuerza de contracción de 6 a 15 veces mayor que la de otros teleósteos (Hemmingsen y Douglas, 1970). Es interesante saber que el corazón puede en algunos casos contener bajas concentraciones de mioglobina, la cual podría aumentar localmente la difusión de oxígeno al tejido (Douglas y otros, 1985).

La viscosidad de la sangre se incrementa de manera acentuada a bajas temperaturas, pero en los caníctidos este incremento es atenuado por la reducción del número de células sanguíneas (Hemmingsen y Douglas, 1972). Las presiones sanguíneas de los peces de hielo son sustancialmente más bajas que las de aquellos teleósteos que poseen glóbulos rojos (Holeton 1970; Hemmingsen y Douglas, 1977), lo que se puede atribuir tanto a la baja viscosidad sanguínea como al gran diámetro de sus capilares, y podría reducir el gasto cardíaco. Aún así, la mitad de los requerimientos energéticos de los caníctidos en reposo corresponde a la suma de los trabajos cardíaco y respiratorio (Hemmingsen y otros, 1972). En reposo, las tasas de consumo de oxígeno en los caníctidos tienden a ser similares, o apenas menores, que las de otros nototenoideos antárticos (Holeton 1970; Hemmingsen y Douglas, 1970, 1977).

En la respiración acuática el movimiento de los gases a través de la superficie respiratoria sólo puede ocurrir por difusión, tanto en la toma de O_2 como en la eliminación de CO_2 . Esto puede estar facilitado por la acción de pigmentos respiratorios en la sangre (como la hemoglobina o la hemocianina),

pero no ha sido demostrada la acción de transporte activo. Por lo tanto el intercambio de cada gas a través de la superficie respiratoria puede ser descrito en forma simple por la ecuación de difusión de Fick

$$M_{O_2} = \frac{k \cdot A}{E} \cdot \Delta P$$

donde M_{O_2} es la velocidad de difusión de gas movido a través de las branquias (en $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1}$), k es la constante de difusión (en $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$), A es el área de la superficie de intercambio gaseoso (en mm^2), E es el grosor promedio de la barrera de intercambio de gas (en mm), y ΔP es el gradiente de presión parcial para el gas a través de la superficie respiratoria (en $\text{atm} \cdot \text{mm}^{-1}$).

La constante de difusión K (constante de Krogh) considera no sólo la simple difusión física (D) sino además el coeficiente de solubilidad del medio adyacente (β), entonces $k = D \cdot \beta$. En soluciones acuosas donde el CO_2 es muy soluble, la k_{CO_2} excede a la k_{O_2} en aproximadamente 25 veces. Por lo tanto, en los intercambiadores gaseosos de los animales acuáticos, se considera a la difusión del O_2 , más que a la del CO_2 , como el factor limitante y a la captación de O_2 , el factor prioritario en el diseño evolutivo de los sistemas respiratorios.

Según la ecuación de Fick, en los peces de hielo la velocidad de difusión M_{O_2} sería elevada porque aumentaría el gradiente de presión parcial para el gas (ΔP) a través de la superficie respiratoria como consecuencia de forzar el paso del agua para que la PO_2 se mantenga alta en la cámara branquial, y dentro del epitelio branquial, y así facilitar la entrada de O_2 a la sangre por difusión simple. A su vez la alta tasa de perfusión mantiene baja la PO_2 del plasma en contacto con la superficie respiratoria.

La capacidad de transporte de oxígeno medida en el plasma de los peces de hielo es de 0.67 % (V/V), es decir, diez veces menos que las medidas en nototénidos. Høleton (1970) ha registrado en sus experimentos con el pez de hielo *C. aceratus*, un gradiente pronunciado de PO_2 a través de las branquias junto con

un valor alto de PO_2 en el agua espirada, con el consecuente bajo porcentaje de extracción de O_2 . Estos hallazgos indican que la PO_2 dentro de las células branquiales de los peces sin hemoglobina debe ser mucho más alta que la presente en su contraparte, es decir, en los peces con glóbulos rojos.

Defensas antioxidantes en peces antárticos

Una apreciable cantidad del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) debería ser producida dentro del tejido branquial de los peces de hielo debido a la alta PO_2 presente dentro de sus células. El anión superóxido, al ser una especie con cargas, no puede difundir a través de las branquias. En consecuencia, esta especie activa del oxígeno debe ser convertida en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dentro de las células branquiales por la enzima superóxido dismutasa. Nuestros resultados concuerdan con lo antes expuesto pues muestran que la actividad de SOD branquial de los peces de hielo es 3 veces más alta que la observada en los nototénidos.

En su trabajo de 1994, Wilhelm Filho y otros, reportaron que la mayoría del peróxido de hidrógeno producido es eliminado por difusión simple hacia el agua. Por lo tanto, la difusión de esta molécula a través de las branquias parecería ser el mecanismo utilizado para mantener un bajo nivel en el estado estacionario de la concentración de esta especie reactiva del oxígeno en este tejido. Esta situación sería particularmente cierta para los peces de hielo que poseen altas tasas de ventilación branquial. Por ejemplo, el valor del área de superficie branquial de *C. aceratus* es relativamente bajo, ofreciendo poca resistencia al flujo de agua y permitiendo altas tasas ventilatorias. En proporción, la extracción de oxígeno del agua branquial es baja, pero el gran volumen, que discurre a través de las branquias, asegura que esta situación sea muy efectiva en el proceso de oxigenación de la sangre (Macdonald y otros, 1987). Nuestros resultados muestran que las especies de caníctidos estudiadas poseen muy bajos niveles de actividad de catalasa branquial en comparación con los observados en los nototénidos. En este sentido, la teoría de la expresión coordinada de las enzimas antioxidantes propuesta en trabajos anteriores, donde se sugiere que altos niveles

de actividad de SOD se ven acompañados por altos niveles de actividad de las enzimas que convierten H_2O_2 (Harris, 1992; Cassini y otros, 1993), parecería no cumplirse para las enzimas branquiales de los peces de hielo considerados en el presente trabajo. Más aún, mientras la actividad branquial de SOD es significativamente alta, las actividades de CAT y GPx son varias veces más bajas que en las branquias de los nototénidos. Por lo tanto, como ha sido mencionado en párrafos anteriores, en los peces de hielo la concentración alta de H_2O_2 , producto de la actividad de SOD dentro de las branquias, debería ser eliminada hacia el agua por simple difusión sin ningún tipo de conversión enzimática. La alta tasa ventilatoria observada en los caníctidos favorece dicha difusión.

Por el contrario, la actividad de SOD en la sangre de los nototénidos es mucho más alta que en los peces de hielo. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los nototénidos poseen una capacidad de transporte de oxígeno, 9 a 10 veces mayor que la de los caníctidos (Holeton, 1970), debido a la acumulación de altas concentraciones de O_2 ligado a hemoglobina.

Aproximadamente el 33% del citoplasma de un glóbulo rojo está constituido por hemoglobina. Cada uno de los cuatro grupos hemo de la hemoglobina está localizado en cada una de las cuatro subunidades proteicas. A medida que los eritrocitos pasan por los canales de las laminillas secundarias de las branquias, la mayoría de los anillos del hemo se coordinan con el O_2 . El hierro del anillo del hemo de la desoxihemoglobina se encuentra como Fe^{2+} . Cuando se produce el ataque del oxígeno, se forma una estructura intermedia en la cual un electrón se halla deslocalizado entre el ión hierro y el O_2



La unión es de carácter intermedio entre la del Fe^{2+} ligado al O_2 y la del Fe (III) ligado al superóxido. Es muy común, entonces, que la molécula de oxihemoglobina sufra una descomposición, se forme metahemoglobina (que es incapaz de ligar O_2) y se libere $O_2^{\cdot-}$



Estas son las razones por las que los eritrocitos deben protegerse del estrés oxidativo originado por la formación de $O_2^{\cdot-}$ (Figura 13).

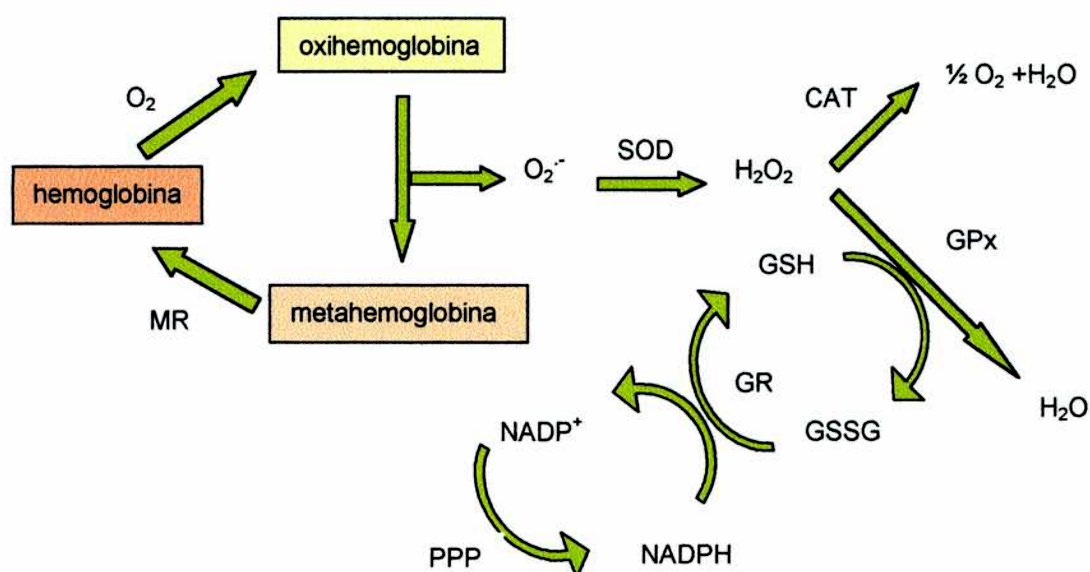


Figura 13. Protección de los eritrocitos contra el daño oxidativo. MR, metahemoglobina reductasa; SOD, Cu-Zn superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; PPP, camino de las pentosas (primera enzima: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (tomado de Halliwell y Gutteridge, 1999)

La actividad de SOD no mostró diferencia alguna dentro o entre las familias en los demás tejidos estudiados (hígado, corazón y músculo). Estas últimas observaciones difieren de aquellas reportadas por Cassini y otros (1993), quienes han detectado alta actividad de SOD en los mismos tres órganos del nototénido antártico *Pagothenia bernacchii* comparado con el pez de hielo *Chionodraco hamatus*. Debe tenerse en cuenta que estas últimas especies fueron colectadas en aguas del Mar de Ross, a menor profundidad, donde soportan temperaturas cercanas al punto de congelación del agua de mar, pues esa porción de mar antártico por lo general conserva su cobertura de hielo aun en verano.

La actividad de las enzimas antioxidantes que toman al H_2O_2 como sustrato, también debería ser menor en los tejidos de los caníctidos que en los de los nototénidos, considerando la posible difusión de H_2O_2 , producto de la actividad de SOD, hacia fuera de los eritrocitos en el último grupo. En acuerdo a esta teoría, la actividad de CAT observada en todos los tejidos analizados, excepto en músculo, es mucho menor en los peces de hielo que en los nototénidos. Por otra parte, exceptuando a las branquias, la actividad de GPx mostró variaciones pronunciadas entre tejidos pero no entre familias.

La mayoría de los peces antárticos poseen acúmulos sustanciales de lípidos, que se considera que juegan un rol primordial en la flotabilidad y en el metabolismo aeróbico (Eastman y De Vries, 1982; Eastman, 1993). Estos acúmulos, en pequeñas gotas o en sacos lipídicos, sugieren que los ácidos grasos son el combustible principal para el metabolismo energético de estas especies. Esta idea ha recibido soporte experimental directo a partir de los resultados de investigadores como Sidell (1991) que, junto a Crockett (1993), han observado en corazón, músculo rojo pectoral e hígado de los nototénidos, que el metabolismo energético aeróbico depende principalmente de la oxidación de ácidos grasos no saturados. La inclusión intracelular de lípidos cumple dos funciones adicionales que también deberían ser consideradas (Sidell, 1991) y se pueden resumir de la siguiente manera: (a) la presencia de gotas lipídicas puede aumentar la tasa de difusión del oxígeno entre los capilares y las mitocondrias; (b) los lípidos intracelulares funcionarían como el mayor reservorio de oxígeno, supliéndolo a las mitocondrias frente a grandes variaciones en la concentración del mismo durante los cambios de actividad muscular.

El hecho de que los ácidos grasos no saturados sean altamente susceptibles al ataque de los radicales derivados del oxígeno, los cuales pueden producir su peroxidación a través de una cadena de reacciones oxidativas (Roberfroid y Buc Calderon, 1995), podría estar relacionado con los relativamente altos niveles de actividad de GPx en corazón y en hígado, comparados con los de músculo y branquias, en las especies que hemos estudiado. Por un lado, se sabe que los hepatocitos del nototénido *Dissostichus mawsoni* poseen numerosas

gotas lipídicas (Eastman, 1993), y por el otro, el corazón de los nototenoideos, como ya ha sido mencionado, utiliza reservas de lípidos como combustible, lo que aumentaría en ambos casos el nivel de peroxidación lipídica en estos órganos.

La vitamina E mostró pocas diferencias claras entre familias y entre los distintos tejidos. En particular, los niveles de esta vitamina en músculo son marcadamente altos en los caníctidos comparados con los nototénidos. Este hecho podría estar correlacionado con la alta densidad del volumen de las mitocondrias por volumen de fibra muscular de los caníctidos comparados con otros peces de habitats similares (Johnston y otros, 1998). En los peces antárticos, las miofibrillas del músculo rojo, implicado en la natación sostenida, están por lo general ordenadas en bandas de una fibrilla de espesor rodeada por mitocondrias, reduciendo así la distancia de difusión de los metabolitos. El resultado neto es que aún en especies de muy baja velocidad de natación, como *Pleurogramma antarcticum*, el 50-60% del volumen de la fibra muscular está ocupado por mitocondrias (Johnston y otros, 1994). Las membranas biológicas, en especial aquellas de las mitocondrias y el retículo endoplasmático (fracción microsomal), contienen grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son susceptibles de ser peroxidados (Kornbrust y Mavis, 1980). Además, una elevada cantidad de fosfolípidos no saturados de diversas clases incrementa la fluidez y el buen funcionamiento de las membranas biológicas a temperaturas cercanas al punto de congelación. La vitamina E, por su carácter lipofílico, se localiza en la región hidrofóbica de las membranas y de las lipoproteínas. Actúa principalmente atrapando a los radicales peroxilo involucrados en las cadenas de peroxidación lipídica (Roberfroid y Buc Calderon, 1995).

La técnica de TRAP, como ha sido explicada en la sección correspondiente a materiales y métodos, fue desarrollada principalmente para detectar la capacidad antioxidante asociada a moléculas hidrosolubles. Por lo general esta técnica ha sido utilizada para evaluar la cantidad y calidad de los antioxidantes presentes en muestras de plasma bajo distintas condiciones experimentales y, en

menor medida, ha sido empleada para evaluar el contenido total de antioxidantes presentes en otros fluidos (saliva, fluido cerebroespinal, fluido seminal, homogenatos y fracciones citosólicas de cerebro, hígado, corazón y riñón). En estos sistemas el valor de TRAP es muy diferente que el de plasma ya que es poco influido por los niveles de ácido úrico de las muestras. Por ejemplo, mientras en plasma el ácido úrico presente se correlaciona con más del 40% del TRAP, apenas es negligible su contribución en el TRAP de las fracciones citosólicas de los homogenatos. La evaluación del TRAP en fracciones citosólicas permite una rápida y simple evaluación de las defensas hidrofílicas de diferentes tejidos. En estos sistemas se considera que los valores de TRAP están principalmente determinados por la concentración de glutatión (Romay y otros, 1996). Además de su función como cofactor para la actividad de la familia de las glutatión peroxidasas, el glutatión reducido está implicado en otros procesos metabólicos, incluyendo el metabolismo del ácido ascórbico. Los valores de TRAP que hemos obtenido en hígado y corazón de las distintas especies estudiadas, reflejan en parte la contribución de GSH como cofactor de la GPx. Los valores más bajos de GPx observados en el músculo de los caníctidos coinciden con los valores más bajos de TRAP para el mismo tejido y, en el caso del músculo de los nototénidos, esta técnica no fue lo suficientemente sensible.

Es bien conocido que un compuesto hidrosoluble como el ácido ascórbico (vitamina C) participa en la regeneración del poder antioxidante de la vitamina E (Figura 14). Debería esperarse entonces una respuesta coordinada en los niveles de ambos compuestos antioxidantes. Nuestros resultados mostraron altos valores, tanto para los niveles de la vitamina E como para el TRAP, en hígado y corazón de *N. rossii* en comparación con las otras especies estudiadas.

En el músculo de los caníctidos también se vería esta coordinación entre el valor de TRAP aumentado y el alto contenido de vitamina E registrado (2 a 4 veces más que en los nototénidos). Esto respondería probablemente al incremento observado en la densidad del volumen de las mitocondrias por volumen de fibra muscular (Johnston y otros, 1998). Cabe recordar que en todas las células aeróbicas, las cadenas de transporte de electrones son probablemente

la fuente de producción más importante *in vivo* de anión superóxido. A niveles de O_2 fisiológicos, se ha sugerido que alrededor del 1-3% del oxígeno reducido en la mitocondria puede formar $O_2^{\cdot-}$. Por lo tanto, al haber una gran cantidad de mitocondrias presente en las células musculares, como sucede en algunas especies de peces de hielo, aumentaría la tasa de formación de las especies activas del oxígeno y la posibilidad de ataque a los lípidos que forman parte de membranas (mitocondrial y citoplasmática) con su consecuente peroxidación. Los niveles de vitamina C, entonces, se verían incrementados en músculo actuando en la regeneración de la vitamina E necesaria para neutralizar dicho proceso oxidativo.

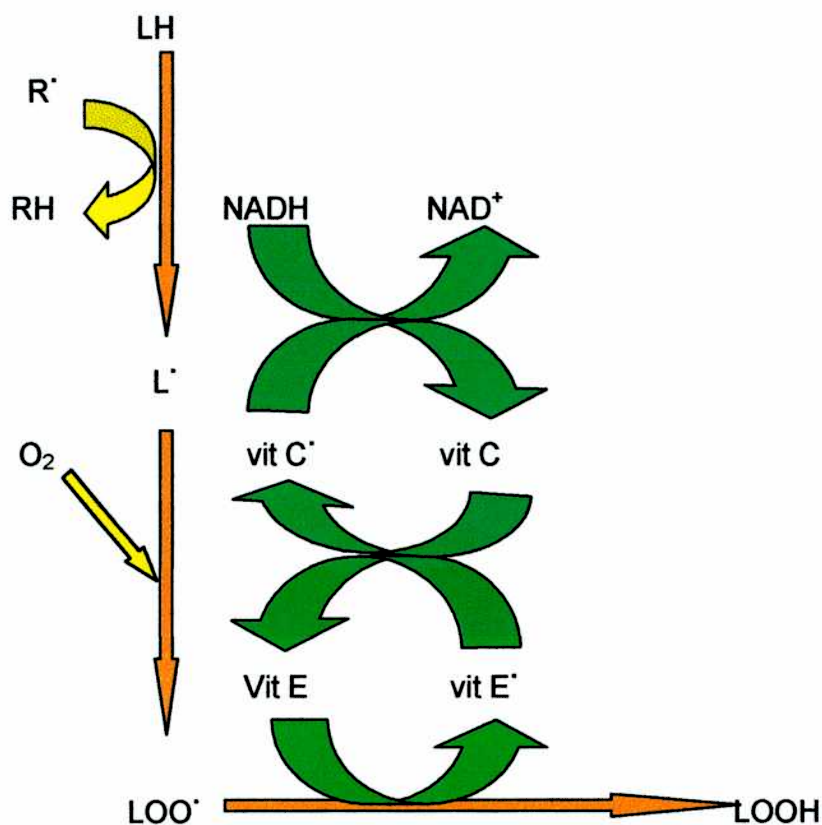


Figura 14. Efecto cooperativo entre el ácido ascórbico (vit C) y el α -tocoferol (vit E).
 LH: lípido no saturado, R \cdot : cualquier radical sin cargas (OH \cdot , alcoxilo, etc) (tomado de Roberfroid y Buc Calderon, 1995).

Estructura y morfometría branquial

A grandes rasgos, la morfología branquial de la laminilla secundaria, sitio en donde se produce el intercambio gaseoso, no difiere demasiado entre los nototenoideos estudiados en el presente trabajo. Sí se aprecian diferencias en el epitelio simple que recubre a las laminillas de los peces de hielo, el cual aparece como ondulado en la superficie apical. Estas observaciones concuerdan con las tomadas en *C. aceratus* por Hughes y Byczkowska-Smyk (1974), quienes observaron al microscopio electrónico que la superficie externa, del epitelio de la laminilla secundaria de la branquia, era lisa y sin microvellosidades distintivas aunque tenía ondulaciones. En los nototénidos este epitelio aparece completamente liso.

En comparación con peces de aguas templadas, el único hecho destacable es la presencia de algunas células mucosas en la laminilla secundaria de algunas especies de nototenoideos como *D. eleginoides*. Restaría saber si esta situación está relacionada con la función respiratoria de la laminilla a temperaturas por debajo de cero grado.

En los caníctidos, la ausencia de hemoglobina no se refleja en alguna alteración estructural de la morfología branquial (Steen y Berg, 1966). La entrada de oxígeno a través de la piel, sin escamas, podría tener un peso importante en estos organismos (Ruud, 1965; Hemmingsen y Douglas, 1970), aunque esta alternativa funcional aún genera controversias (Eastman, 1993).

Comparando los datos de las distancias de difusión entre la sangre y el agua en las laminillas secundarias, que varían entre 2.11 y 6 μm (Resultados, Tabla 6), con los presentados por Hughes (1984), se concluye que los nototenoideos estudiados entran dentro del rango de medidas típico observado en los teleósteos marinos. En la revisión de Hughes se utiliza como estándar de peces relativamente inactivos la media de la distancia sangre-agua de 5 especies de pleuronéctidos y soleidos (peces del tipo de los lenguados), que muestra valores que varían entre 2.8 y 5.6 μm . En el otro extremo de actividad, las distancias en escómbridos, como los atunes y los "mackerels", que varían entre los 0.6 y 1.2 μm .

Entre los nototenoideos el aumento en el grosor de las laminillas secundarias es ontogénico, es decir, las laminillas se van engrosando a medida que el pez crece. Los datos de las distancias correspondientes a alevinos ($0.4 \mu\text{m}$) y juveniles ($1.6 \mu\text{m}$) de *N. rossii* medidos por Westermann y otros (1984) y los observados por nosotros en adultos ($4.72 \mu\text{m}$), muestran una correlación con el cambio de hábito de pelágico a béntico que experimentan los individuos de esta especie a lo largo de su ciclo de vida.

Existe además, una relación inversa entre el grosor del epitelio de las laminillas secundarias y el nivel de actividad del pez. A mayor nivel de actividad aumentan los requerimientos metabólicos de oxígeno, que necesita forzosamente ser incorporado al organismo con mayor rapidez y la distancia de difusión agua-sangre se hace más corta (Steen y Berg, 1966). De las especies que hemos estudiado, los peces más activos, de hábito pelágico (*D. eleginoides*) o semipelágico (*C. gunnar*), poseen distancias de difusión más cortas que los menos activos, de hábito béntico (*C. aceratus*, *P. georgianus* y *N. rossii*) (Eastman, 1993).

Es interesante remarcar el hecho de que las branquias de las especies de peces estudiadas posean niveles de actividad de las enzimas antioxidantes similar al observado en los tejidos metabólicamente activos como músculo, hígado y corazón. Considerando que gran parte del tejido branquial está formado por células delgadas con escasa actividad metabólica, que permiten un efectivo intercambio de gases, la presencia de alta actividad de SOD en las branquias de los caníctidos, no puede responder a la alta tasa de producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a partir de la cadena respiratoria, se puede inferir entonces que la elevada actividad de esta enzima debe contrarrestar la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ debida al marcado gradiente de PO_2 generado en las branquias de estas especies como se había sugerido antes.

Por otra parte, las branquias de los nototénidos, también, poseen valores de actividad de CAT y GPx similares a los observados en tejidos metabólicamente activos antes mencionados. Más aún, la actividad branquial de GPx fue mas alta que la de músculo. Esto se corresponde con la necesidad de convertir

rápidamente el H_2O_2 formado por la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$, en las branquias y en los eritrocitos, evitando de esta manera daños posteriores. En estos peces, como ya se ha mencionado, la presencia de hemoglobina en los eritrocitos hace que las células del epitelio branquial no requieran de un gradiente interno de oxígeno elevado y por lo tanto la tasa de ventilación de estas especies debe ser menor que en los canfctidos. En estas condiciones, la simple difusión del H_2O_2 hacia el exterior se tornaría más lenta con la consecuente acumulación dentro del tejido.

Del análisis de los resultados podemos concluir que:

El sistema de defensa enzimático antioxidante de las branquias muestra diferencias entre las familias en el manejo de las especies activas de oxígeno formadas *in situ* ($O_2^{\cdot -}$) o provenientes de eritrocitos adyacentes al epitelio branquial (H_2O_2) (Figura 15). Mientras en los caníctidos la SOD juega una función fundamental en la detoxificación de las células del epitelio branquial, en los nototénidos el peso de esta función recae principalmente en la CAT y la GPx.

La morfología y la morfometría branquial concuerda con el grado de actividad desarrollado por cada especie de pez independientemente de la familia a la que pertenezca. Peces más activos como *D. eleginoides* (de hábito pelágico) y *C. gunnari* (de hábito semipelágico), poseen laminillas secundarias con epitelios finos que permiten una rápida captación y vehiculización del O_2 . Peces menos activos, de hábito béntico, como *N. rossii*, *C. aceratus* y *P. georgianus*, poseen laminillas secundarias gruesas.

El epitelio branquial de las laminillas secundarias de los peces antárticos presenta actividad de las enzimas antioxidantes comparable con la de otros tejidos metabólicamente más activos como el hígado, el músculo y el corazón.

La vitamina E y la capacidad antioxidante total se expresan en forma coordinada y responden a la presencia significativamente alta de ácidos grasos no saturados en los distintos tejidos de los peces antárticos. De esta manera, tanto la vitamina E como los antioxidantes hidrosolubles, como el ácido ascórbico y el glutatión, aseguran la protección contra la peroxidación de lípidos y preservan el buen funcionamiento de las membranas biológicas.

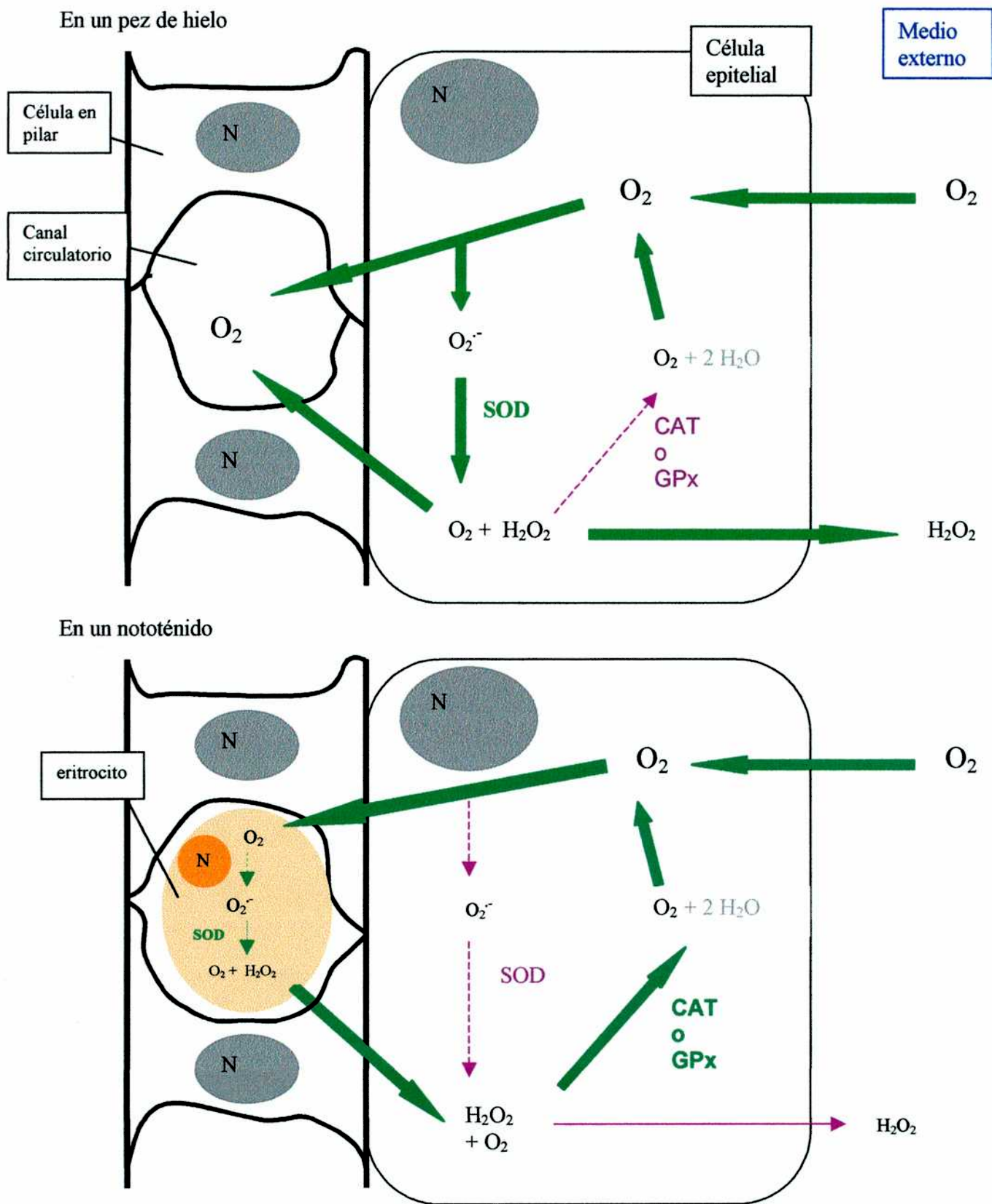


Figura 15. Esquema del sistema antioxidante enzimático en branquias de peces antárticos.

B

- Acierno R., Macdonald J.A., Agnisola C. y Tota B. (1995). Blood volume in the hemoglobinless Antarctic teleost *Chionodraco hamatus* (Lönnberg). *The Journal Exper. Zool.* 272: 407-409.
- Andersen N.C. (1984). Genera and subfamilies of the family Nototheniidae (Pisces, Perciformes) from the Antarctic and Subantarctic. *Steenstrupia* 10: 1-34.
- Atkins P. (1991). *Fisicoquímica*. Ed. por Addison-Wesley Iberoamericana, Estados Unidos, pp 834-837.
- Atkinson A. y Peck J.M. (1990). The distribution of zooplankton in relation at the South Georgia shelf in summer and winter. *Antarctic Ecosystems*. Kerry & Hempel Ed. pp.159-165.
- Balushkin A.V. (1990). Review of blue notothenias of the genus *Paranotothenia* Balushkin (Nototheniidae) with description of a new species. *J. Ichthyol.* 30 (6): 132-147.
- Balushkin A.V. (1991). Review of green notothenias, *Gobionotothen*, Balushkin (Nototheniidae) of the Antarctic and Subantarctic. *J. Ichthyol.* 31 (8): 42-55.
- Beauchamp C. y Fridovich I. (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta* 317: 50-64.
- Boveris A., Oshino N. y Chance B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128: 617-630.
- Boveris A. y Cadenas E. (1997). Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. En: "Oxygen, gene expression and cellular function" Ed. por L. Clerch y D. Massaro. Marcel Dekker, Inc. New York. pp 1-25.
- Burton G. e Ingold K. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 6471-6477.
- Burton G., Joyce A. e Ingold K. (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?, *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 281-290
- Buttris J. y Diplock A. (1984). High-performance liquid chromatography method for vitamin E in tissues. *Methods in Enzymology* 105: 101-138.
- Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem.* 58: 79-110.

- Cadenas, E.; Giulivi, C.; Ursini F. y Boveris, A. (1994) Electronically excited state formation. *Methods in Toxicology*. Vol. 1B, 384-399.
- Cassini A., Favero M., Albergoni V. (1993). Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded Antarctic Teleost fish. *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 106C, 2: 333-336.
- Chance B. (1954). Special methods: Catalase. In: Glick R (ed). *Methods of Biochemical Analysis*. New York: Wiley-Interscience, pp 408-424.
- Chance B., Sies H. y Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- Ciardiello M.A., Camardella N. y di Prisco G. (1997). Enzymes in cold-adapted Antarctic fish: glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Antarctic communities. Species, structure and survival*. Battaglia B, Valencia J and Walton DWH (eds.). Cambridge, University Press, pp 261-265.
- Clarke A. (1983). Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 21: 341-453.
- Clarke A. (1988). Seasonality in the Antarctic marine environment. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 90B: 461-473.
- Clarke A. y Crame J.A. (1992). The Southern Ocean benthic fauna and climate change: a historical perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 338 (B): 299-309.
- Clarke A. y Johnston I.A. (1996). Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. *Trends Ecol. Evol.* 11: 212-218.
- Crame J.A. (1993). Bipolar molluscs and their evolutionary implications. *Journal of Biogeography* 20: 145-161.
- Crockett E.L. y Sidell B.D. (1990). Some pathways of energy metabolism are cold adapted in Antarctic fishes. *Physiol. Zool.* 63: 472-488.
- Crockett E.L. y Sidell B.D. (1993). Substrate selectivities differ for hepatic mitochondrial and peroxisomal β /oxidation in an Antarctic fish, *Notothenia gibberifrons*. *Biochem. J.* 289: 427-433.
- Detrich H.W. III (1998). Molecular adaptation of microtubules and microtubular motors from Antarctic fish. In: di Prisco G, Pisano E and Clarke A (eds.). *Fishes of Antarctica: a biological overview*. Springer-Verlag, Italia, pp139-150.

De Witt H. (1971) Coastal and deep water benthic fishes of the Antarctic. In Antarctic Map Folio Series, vol. 15 (ed. B. Bushnell), pp 1-10. New York; American Geographical Society.

Diplock A. (1983). The role of vitamin E in biological membranes. En: "Biology of vitamin E. Pitman Books, London. pp. 45-55.

Dirks R.C., Faiman M.D., Huyser E.S. (1982). The roles of lipid free radical initiator, and oxygen on the kinetics of lipid peroxidation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63: 21-28.

di Prisco G. (1997). Physiological and biochemical adaptations in fish to a cold marine environment. In Antarctic communities. Species, structure and survival. Battaglia B, Valencia J and Walton DWH (eds.). Cambridge, University Press, pp 251-260.

Douglas E.L., Peterson K.S., Gysi J.R. y Chapman D.J. (1985). Myoglobin in the heart tissue of fishes lacking hemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A: 855-888.

Eastman J.T. (1993). Antarctic fish biology. Evolution in a unique environment. Academic Press. New York.

Eastman J.T. y DeVries A. (1982). Buoyancy studies of notothenioid fishes in McMurdo sound, Antarctica. *Copeia*, 1982 (2): 385-393.

Eastman J.T. y Grande L. (1989). Evolution of the Antarctic fish fauna with emphasis in the recent notothenioids. En: *Origins and Evolution of the Antarctic Biota* (ed. J. Crame), pp 241-252; Geological Society Special Publication.

Ekau W. (1991). Reproduction in high Antarctic fishes (Notothenioidei). *Meeresforsch* 33: 159-167.

Ernster L. (1986) Oxygen as environmental poison. *Chemica Scripta.* 26: 525-534.

Farber J. (1994). Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl 2): 17-24.

Fischer W. y Hureau J.C. (1985). FAO species identification sheets for fishery purposes. Southern Ocean (fishing areas 48, 58, 88) (CCMLAR Convention Area). Prepared and published with the support of the Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources. Rome, FAO, Vol. 2: 233-470.

Fitzgerald J.P. (1992). Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. *Comp. Biochem Physiol.* 101 B: 111-114.

Flohé L., Gunzler A. y Schock H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32: 132-134.

Flohé L., Gunzler W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology*, vol. 105 (Packer L, ed). Academic Press, NJ, pp 114-121

Forman H. y Thomas M. (1986). Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 669-680.

Fridovich I. (1984). Biological sources of superoxide. *Methods in Enzymol.* 105: 59-61.

Gershman R., Gilbert D., Nye S., Dwyer P. y Fenn W. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626.

Green M. y Hill H. (1984). Chemistry of dioxygen. *Methods in Enzymol.* 105: 3-9.

Haber F. y Weiss J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London* 147: 322-351.

Halliwell B. (1996). Uric acid: An example of antioxidant evaluation. En: "Handbook of antioxidants" Ed. por L. Packer y E. Cadenas. Marcel Dekker, New York. pp. 243-256.

Halliwell B. y Gutteridge J. (1999a). Chapter 1: Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. En "Free Radicals in Biology and Medicine" Third edition, Oxford University Press, pp 1-33.

Halliwell B. y Gutteridge J. (1999b). Chapter 4: Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. En "Free Radicals in Biology and Medicine" Third edition, Oxford University Press, pp 246-350.

Halliwell B. y Gutteridge J. (1999c). Chapter 3: Antioxidant defences. En "Free Radicals in Biology and Medicine" Third edition, Oxford University Press, pp 105-245.

Halliwell B. y Gutteridge J. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1: 1-8.

Harris E.D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 6: 2675-2683.

Hemmingsen E.A. y Douglas E.L. (1970). Respiratory characteristics of haemoglobin-free fish *Chaenocephalus aceratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 33: 733-744.

Hemmingsen E.A. y Douglas E.L. (1977). Respiratory and circulatory adaptations to the absence of haemoglobin in Chaenichthyid fishes. In: Llano GA (ed). *Adaptations within Antarctic ecosystems*. Washington DC: Smithsonian Institution, pp 479-487.

Holeton G.F. (1970). Oxygen uptake and circulation by hemoglobinless Antarctic fish (*Chaenocephalus aceratus* Lonnberg) compared with three red-blooded Antarctic fish. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 34: 457-471.

Hughes G.M. (1972). Distribution of oxygen tension in the blood and water along the secondary lamella of the icefish gill. *Journal of experimental Biology* 56: 481-492.

Hughes G.M. y Byczkowska-Smyk W. (1974). Ultrastructure of the secondary gill lamella of the icefish, *Chaenocephalus aceratus*. *J. Zool.*, London: 79-87.

Hughes G.M. (1984). General anatomy of the gills. In "Fish Physiology" (W.S. Hoar and D.J. Randall, eds.), Vol XA, pp. 1-72. Academic Press, Orlando.

Johnston I.A., Guderley H., Franklin C.E., Crockford T y Kamunde C. (1994). Are mitochondria subject to evolutionary temperature adaptation? *Journal of Experimental Biology* 195: 293-306.

Johnston I.A., Calvo J., Guderley H., Fernandez D.A. y Palmer L. (1998). Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *The Journal of Exp. Biol.* 201: 1-12.

Kameya A y Llellish M. (1999). Investigación del bacalao de profundidad *Dissostichus eleginoides* a lo largo del litoral peruano. Reúmenes del VIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar (COLACMAR), vol I (ed. A. Tresierra Aguilar y Z. Culquichicón Malpica), pp 247. Trujillo, Perú.

Krinsky N. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. Med.* 7: 617-635.

Kock K.H. (1992). *Antarctic fish and fisheries*, pp 359. Cambridge: Cambridge University Press.

Kornbrust D.J. y Mavis R.D. (1980). Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation, correlation with vitamin E content. *Lipids* 15: 315-322.

Lecointre G., Bonillo C., Ozouf-Costaz C. y Hureau J. (1997). molecular evidence for the origins of Antarctic fishes: paraphyly of the Bovichthyidae and no indication for the monophyly of the Notothenioidei (Teleostei). *Polar Biology* 18: 193-208.

Lissi E., Pascual C., Del Castillo M. (1992). Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-amidinopropane thermolysis. *Free Rad. Res. Comm.* 17: 299-312.

Lowry O.M., Rosenbrough N.J., Farr L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193: 265-275.

Machlin L. (1984). Vitamin E. En "Handbook of vitamins", Marcel Dekker, Academic Press, New York. pp 99-145.

Maples K. y Mason R. (1988). Free radical metabolite of uric acid *J. Biol. Chem.* 263: 1709-1712.

Macdonald J.A., Montgomery J.C. y Wells R.M.G. (1987). Comparative physiology of Antarctic fish. *Advances in Marine Biology* 24: 321-388.

Marschoff E.R. (1997). Reproductive strategies of Antarctic Euphausiids (Euphausiacea: Crustacea) as regulatory mechanism of the distribution. Tesis Doctoral. UBA.

Marschoff E.R., Prenskey B., Gonzalez B.N., Calcagno J.A., Remaggi C., Balestrini C. (1994). Preliminary results of the E.L. Holmberg cruise to the Subareas 48.3 and 48.2. WG-FSA-94-29. CCMLAR

Matkovics B., Novák R., Hoang Duc Hanh, Szabó L., Varga Sz I. y Zaleśna G. (1977). A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 56 B: 31-34.

McCord J. y Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. Enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 241: 4353-4356.

Misra H.P. y Fridovich Y. (1972). The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3175.

Norman J. (1937). Coast fishes. Part II. The Patagonian region, pp 1-150; Discovery Report.

Omar B., McCord J. y Downey (1991). Ischemia-reperfusion. En: "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants Ed. por H. Sies. Academic Press, Londres. pp 669-680.

Packer J., Slater T. y Willson R. (1979). Direct observation of free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738

Pryor W. (1976). The role of free radical reactions in biological systems. En: "Free radicals in Biology" Ed. por W. Pryor. New York, Academic Press, vol 1, pp 1-43.

Reagan C.T. (1914). Fishes. British Antarctic (Terra Nova) Expedition 1910. Natural history Report. Zoology 1: 1-54.

Ritchie P.A., Lavoue S. y Lecointre G. (1997). Molecular phylogenetics and the evolution of the Antarctic Notothenioid fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 118 A: 1009-1025.

Roberfroid M. y Buc Calderon P. (1995). Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker, Inc. New York.

Romay C., del Castillo M.C., Pascual C., Campos A.M., Escobar J. y Lissi E.A. (1996). Evaluation of the total content of antioxidants in complex mixtures. *Ciencia e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, vol 48 (1/2):86-95.

Ruud J.T. (1954). Vertebrates without erythrocytes and blood pigment. *Nature* 173: 848-850.

Ruud J.T. (1965). The icefish. *Sci. Amer.*, 213: 108-114.

Schmidt-Nielsen K. (1976). Capítulo 1: La respiración en el agua. En: *Fisiología Animal. Adaptación y medio ambiente*. Ed. Omega, Barcelona. Páginas 3-19.

Schwarzbaum P.J., Wieser W. y Niederstatter H. (1991). Contrasting effects of temperature acclimation on the mechanisms of ionic regulation in a eurythermic and stenothermic species of freshwater fish (*Rutilus rutilus* and *Salvelinus alpinus*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 98A, N° 3-4: 483-489.

Sidell B.D. (1991). Physiological roles of high lipid content in tissues of Antarctic fish species. In: di Prisco G, Maresca B, Tota B (eds). *Biology of antarctic fish*. Springer-Verlag, Berlin, pp 220-231.

Somero G.N., Fields P.A., Hofmann G.H., Weinstein R.B. y Kawall H. (1998). Cold adaptation and stenothermy in Antarctic Notothenioid fishes: What has been gained and what has been lost. In: di Prisco G, Pisano E and Clarke A (eds.). *Fishes of Antarctica: a biological overview*. Springer-Verlag, Italia, pp 97-110.

Steen J.B. y Berg T. (1966). The gills of two species of haemoglobin-free fishes compared to those of others teleosts – with a note of severe anemia in an eel. *Comp. Biochem. And Physiol.* 18: 517-526.

Tosonotto G.V. (2000). Datos de CTD correspondientes a la campaña del BIP "Dr. Holmberg", 1995. Instituto Antártico Argentino. Contribución N° 490.

Turrens J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17,3.

Wayner D.D., Burton G.W., Ingold K.U. (1986). The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent. *Biochim. Biophys. Acta* 884: 119-123.

Wells R.M.G., Ashby M.D., Duncan S.J. y Macdonald J.A. (1980). Comparative study of the erythrocytes and haemoglobin in nototheniid fishes from Antarctica. *J. Fish Biol.* 17: 517-527.

Westermann J.E.M., Barber D.L. y Malo L.G. (1984). Observations on gills of pelagic and demersal juvenile *Notothenia rossii*. *British Antarctic Survey Bulletin* 65: 81-89.

Wilhelm-Filho D., Giulivi C., Boveris A. (1993). Antioxidant defences in marine fish – I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 106C, 2: 409-413.

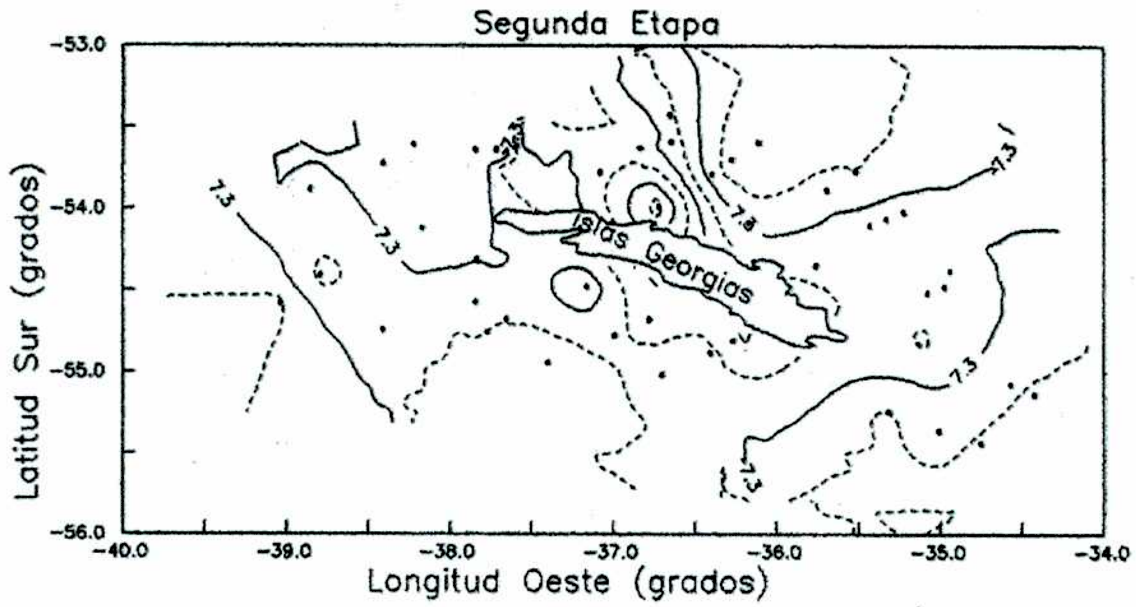
Wilhelm-Filho D., Gonzalez-Flecha B., Boveris A. (1994). Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27: 2879-2882.

Winston G.W. (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 100C, 1/2: 173-176.

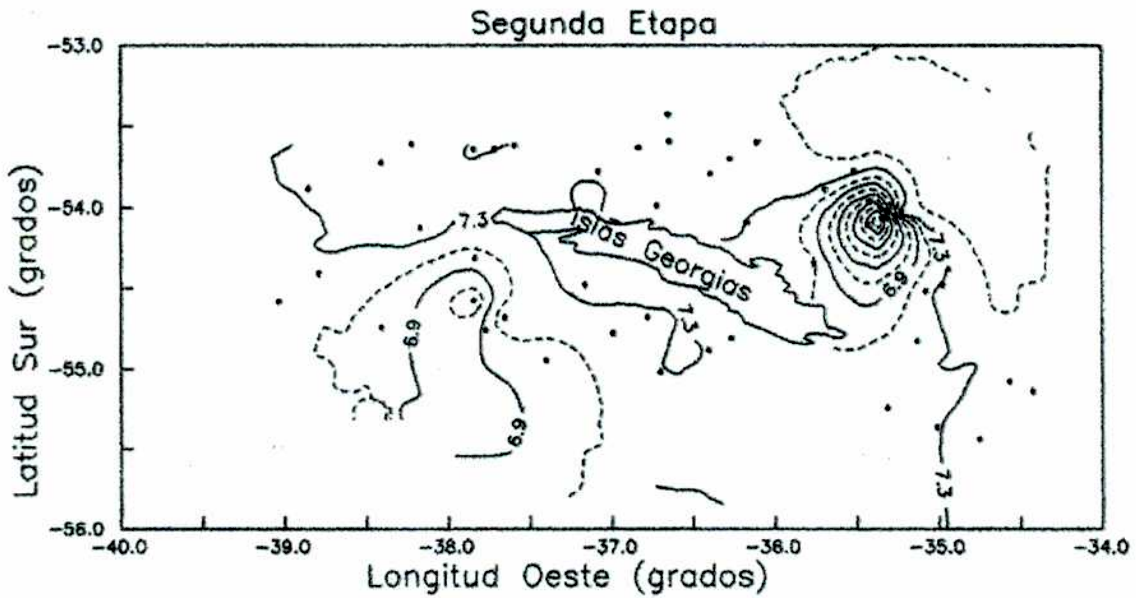
Winston G.W. y Di Giulio R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137- 161.

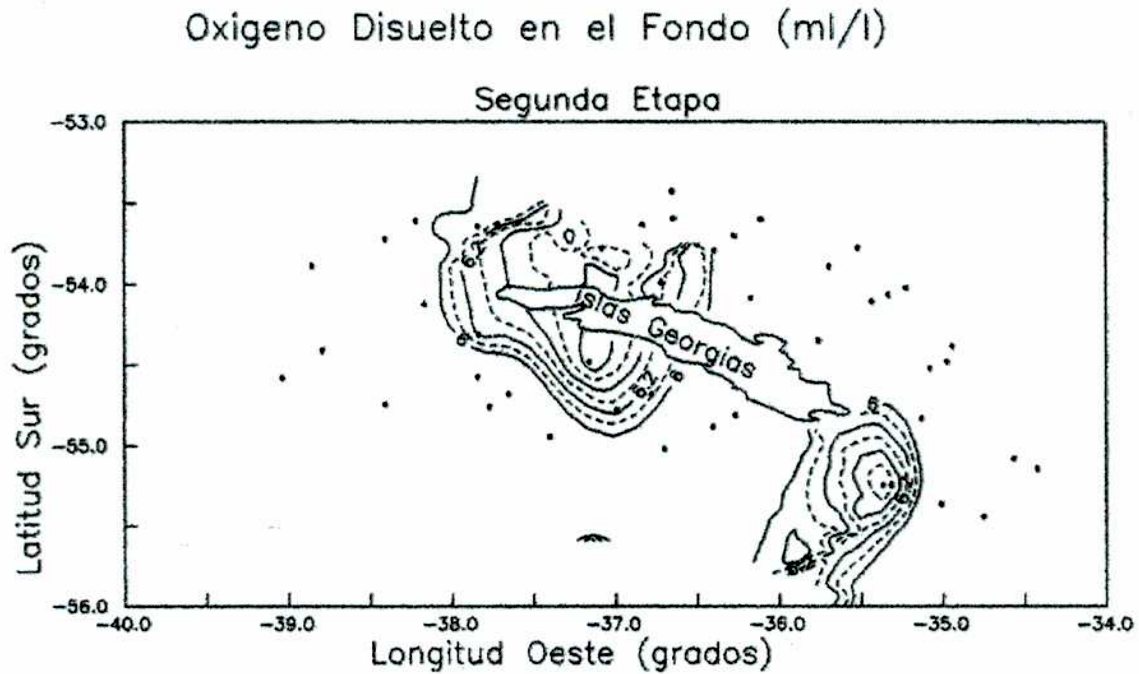
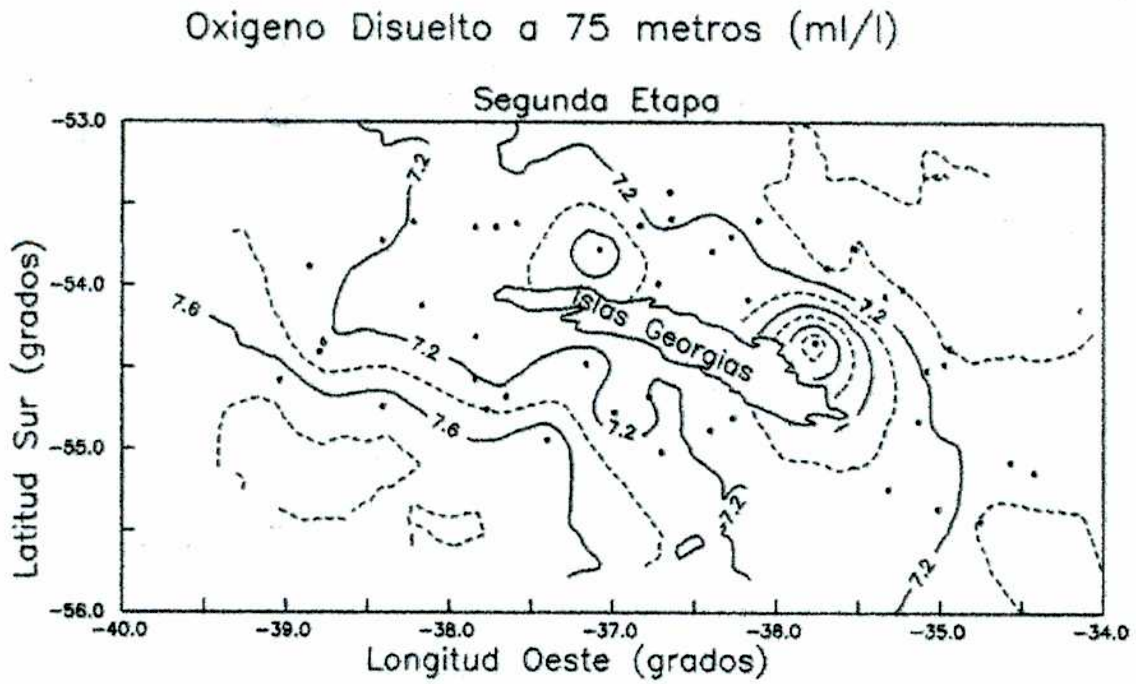
Witas H., Gabryelak T. y Matkovics B. (1984). Comparative studies on superoxide dismutase and catalase activities in livers of fish and other Antarctic vertebrates.. *77 C, 2: 409-411.*

Oxígeno Disuelto en Superficie (ml/l)



Oxígeno Disuelto a 20 metros (ml/l)





Figuras 1 a 4. Curvas de oxígeno disuelto en agua de mar de los alrededores de las islas Georgias del Sur en la campaña 1995 (Tosonotto, 2000).