



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO COMPARATIVO DEL METABOLISMO DE
PURINAS EN EL TURSIÓN (*Tursiops truncatus*) Y EN
EL HUMANO

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

Roberto Isaac López Cruz

La Paz, Baja California Sur, Febrero del 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:15 horas del día 04 del Mes de Febrero del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" Estudio comparativo del metabolismo de purinas en el tursión (*Tursiops truncatus*) y en el humano "

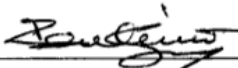
Presentada por el alumno:

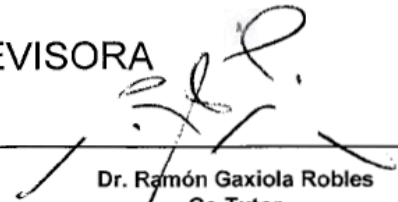
Roberto Isaac López Cruz

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

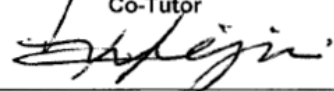
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

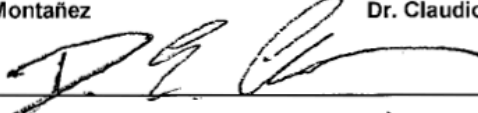
LA COMISIÓN REVISORA

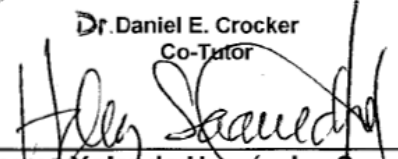

Dra. Tania Zepteno Savín
Director de Tesis


Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-Tutor


Dr. Juan Antonio De Anda Montañez
Co-Tutor


Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz
Co-Tutor


Dr. Daniel E. Crocker
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Tania Zenteno Savín, Directora de Tesis

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

Dr. Juan Antonio De Anda Montañez, Co-tutor

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

Dr. Ramón Gaxiola Robles

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

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz, Co-tutor

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

Dr. Daniel E. Crocker, Co-tutor

Sonoma State University, California, U.S.A

COMITÉ EVALUADOR DE TESIS

Dra. Tania Zenteno Savín

Dr. Juan Antonio De Anda Montañez

Dr. Ramón Gaxiola Robles

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

Dr. Daniel E. Crocker

JURADO DE EXAMEN

Dra. Tania Zenteno Savín

Dr. Juan Antonio De Anda Montañez

Dr. Ramón Gaxiola Robles

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruíz

Dr. Daniel E. Crocker


SUPLENTES

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitov

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Resumen

El metabolismo de purinas está involucrado en diversos procesos fisiológicos en todos los organismos. Entre los más importantes se encuentra la síntesis de nucleótidos, que son constituyentes de los ácidos nucleicos, la de compuestos involucrados en la señalización celular y de moléculas con enlaces de alta energía. Las alteraciones en la actividad de las enzimas y/o concentración de metabolitos involucrados en la síntesis y degradación de purinas se relacionan con numerosas patologías en humanos, incluyendo las condiciones de hipoxia e isquemia/reperfusión. Los mamíferos marinos, no obstante, pueden soportar periodos prolongados de hipoxia e isquemia/reperfusión asociados al buceo. La enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) participa en la vía del reciclado de purinas, su función es catalizar la transformación de hipoxantina (HX) a inosina monofosfato (IMP); los derivados del IMP a su vez forman parte de los nucleótidos como la adenosina trifosfato (ATP). La hipótesis de este trabajo es que los tursiones tienen una elevada actividad de la enzima HGPRT y otros componentes de la vía del reciclado de purinas, en comparación con el humano, lo que evita la acumulación de purinas como hipoxantina (HX) y xantina (purinas no reciclables), así como la degradación de ATP durante los ciclos de hipoxia e isquemia/reperfusión asociados al buceo. Se colectaron 12 muestras de plasma y eritrocitos de tursiones en cautiverio y de humanos voluntarios. La actividad de las enzimas HGPRT, xantina oxidasa (XO) y purina nucleósido fosforilasa (PNP) se analizó por espectrofotometría. La concentración de metabolitos de purinas se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La actividad de la PNP, que cataliza la reacción para producir HX a partir de inosina, fue significativamente mayor en eritrocitos de humanos que de tursiones ($p = 0.001$). La actividad de HGPRT fue significativamente mayor en los eritrocitos de humanos que de tursiones. La actividad de esta enzima en plasma de tursiones fue significativamente mayor que en humanos; además en humanos estuvo por debajo del límite de detección en el 58.3% de las muestras. Los niveles de ácido úrico en plasma de humanos fueron 9 veces mayores que en plasma de tursiones ($p = 0.001$). La concentración de HX fue 4 veces mayor en plasma de tursiones que de humanos ($p = 0.02$). Finalmente, la concentración de ATP en plasma de humanos fue de $0.04 \pm 0.01 \mu\text{M}$, en tanto que, en los tursiones fue de $0.025 \pm 0.009 \mu\text{M}$ ($p = 0.001$). Los resultados indican que la actividad de HGPRT en plasma de tursiones contribuye a prevenir la acumulación y degradación de HX durante los ciclos de buceo. Además, el reciclaje de HX a IMP en el plasma de tursiones podría contribuir a la producción de nucleósidos y nucleótidos de purinas que pueden ser transportados hacia los órganos o tejidos que los requieran.



Directora de tesis
Dra. Tania Zenteno Savín

Abstract

Purine metabolism is involved in several physiological processes in all organisms. Among the most important are the synthesis of nucleotides, as constituents of nucleic acids, of compounds involved in cellular signaling and of high-energy molecules. Alterations in activity of enzymes and concentrations of metabolites involved in the synthesis and catabolism of purines are related to several pathologies in humans, including conditions leading to ischemia/reperfusion and hypoxia. Marine mammals, however, can tolerate periods of hypoxia and ischemia/reperfusion associated with diving. In the purine salvage pathway, the enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) catalyzes the transformation of hypoxanthine (HX) to inosine monophosphate (IMP); the derivatives from IMP subsequently form adenosine triphosphate (ATP). The hypothesis of this study is that bottlenose dolphins have a higher activity of HGPRT and other components of the purine recycling pathway, in comparison with humans, therefore avoiding HX and xanthine (non-recyclable purines) accumulation as well as ATP degradation associated to hypoxia and ischemia/reperfusion diving cycles. We collected 12 plasma and erythrocytes samples from human volunteers and captive dolphins. The activity of HGPRT, xanthine oxidase (XO) and purine nucleoside phosphorylase (PNP) was analyzed by spectrophotometry, and the purine metabolite concentrations were measured using high-pressure liquid chromatography (HPLC). The activity of PNP, which catalyzes the reaction to produce HX from inosine, was significantly higher in human erythrocytes than in dolphins ($p = 0.001$). The HGPRT activity was significantly higher in human erythrocytes than in dolphins. The activity of this enzyme in plasma from dolphins was significantly higher than in humans; additionally in humans it was below the detection limit in 58.3% of the samples. The uric acid levels in plasma from humans were 9-fold higher than in plasma from dolphins ($p = 0.001$). The HX concentration was 4-fold higher in plasma from dolphins than from humans ($p = 0.02$). Finally, plasma ATP concentration in humans was $0.04 \pm 0.01 \mu\text{M}$, while in dolphins was $0.025 \pm 0.009 \mu\text{M}$ ($p = 0.001$). The results suggest that HGPRT activity in plasma from dolphins contributes to prevent HX accumulation and degradation during diving cycles. Further, recycling of HX to IMP in plasma from dolphins contributes to the production of nucleosides and nucleotides, which can be delivered to organs or tissues that require purine compounds.



Directora de tesis
Dra. Tania Zenteno Savín

Dedicatoria

Para Jacob y Valentina con todo mi
cariño

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y al CONACyT por la beca otorgada (registro 270373) para la realización de esta tesis. Agradezco especialmente al Programa de Estudios de Posgrado y a la Biblioteca su invaluable labor.

Al comité tutorial, Dr. Ramón Gaxiola, Dr. Antonio de Anda, Dr. Dan Crocker y Dr. Humberto Mejía por las revisiones, consejos y todo el tiempo que invirtieron en este proyecto. En especial gracias a la Dr. Tania Zenteno, ya son muchos años de conocernos. Siempre estaré agradecido contigo por darme la oportunidad y responsabilidad de usar el laboratorio, y la confianza para desarrollar una parte del proyecto de purinas. Me llevo lo mejor ustedes.

A todo el personal del delfinario Cabo Dolphins por la ayuda en la colecta de las muestras, en particular al Dr. Jaime Bernal y al M.V.Z Alejandro Real.

A los técnicos e investigadores que me abrieron las puertas de sus laboratorios y amablemente hicieron préstamo de sus equipos y tiempo. A Roberto Hernández Herrera, Norma Angélica Ochoa Álvarez, Amada Reyes Salinas y María del Carmen Rodríguez Jaramillo.

Al grupo de estrés oxidativo. Iris y Myrna gracias por su paciencia, confianza y las porras, gracias por creer en el proyecto. A Marce, Bere, Omar, Priscila, Cris Alejandra, Angie, Vane, Lluvia, Caro, Olinda, Raquel, José Pablo, a los viejos, los que se me olvidan, y a los que han estado de pasada, gracias por sus consejos, ayuda y grata compañía. Felicidades a todos por su logros. Muy en especial agradezco a los técnicos del laboratorio de Estrés Oxidativo. Al IBQ. Orlando Lugo Lugo y Norma Olgúin Monroy (Normoxia) su apoyo incondicional, las horas extra, las ideas, las risas y la amistad. Fue un privilegio trabajar con todos ustedes.

A los que siempre están, mi familia y esos viejos amigos. Gracias Lilián, Jacob, Valentina y Leticia por enseñarme que lo que vivo con ustedes día a día se llama felicidad. Ustedes son lo más grande de mi vida.

Contenido

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
Lista de abreviaturas	x
1. Introducción	1
1.1 Generalidades del buceo	1
1.2. Generalidades del tursión (<i>Tursiops truncatus</i>).....	2
1.3. Generalidades del humano.....	3
1.4. Hipoxia e isquemia/reperfusión.....	4
1.5. Metabolismo de purinas.....	7
1.5.1. Vía de la síntesis <i>de novo</i>	7
1.5.2. Vía del reciclado de purinas	9
1.5.3. Catabolismo de purinas.....	11
2. Antecedentes	12
3. Justificación	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
5.1. Objetivos particulares	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Colecta de muestras	20
6.2. Preparación de muestras sanguíneas	22
6.3. Análisis bioquímicos y moleculares	23
6.3.1. Hematocrito y hemoglobina.....	23
6.4. Actividades enzimáticas.....	24
6.4.1. Purina nucleósido fosforilasa	24
6.4.2. Xantina oxidasa.....	25

6.4.3. Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa	26
6.4.4. Inosina monofosfato deshidrogenasa	28
6.4.5. Uricasa	29
6.5. Proteínas totales	30
6.6. Concentración de los metabolitos de las purinas	30
6.7. Análisis estadísticos.....	32
7. Resultados	32
7.1. Hematocrito y hemoglobina	32
7.2. Actividades enzimáticas.....	33
7.2.1. Purina nucleósido fosforilasa	33
7.2.2. Xantina oxidasa.....	33
7.2.3. Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa	34
7.2.4. Inosina monofosfato deshidrogenasa	35
7.3. Concentraciones de metabolitos de las purinas	36
8. Discusión	39
9. Conclusión	52
10. Recomendaciones	54
11. Referencias	55
12. Anexos	65
12.1. Anexo I. Registro de muestras colectadas de tursión.....	65
12.2. Anexo II. Registro de muestras colectadas de humano	66
12.3. Anexo III. Consentimiento informado para toma de muestras.....	67
12.4. Anexo IV. Estandarización de metodologías	72
12.5. Anexo V. Artículo publicado en revista indexada.....	93
12.6. Anexo VI. Artículo sometido.....	98

Lista de figuras

Figura 1. Esquema general del catabolismo de adenosina trifosfato (ATP) y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los procesos de isquemia y reperfusión	6
Figura 2. Producción de inosina monofosfato (IMP) por la vía de la síntesis <i>de novo</i>	8
Figura 3. Producción de xantosina monofosfato (XMP) por la actividad enzimática de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)	9
Figura 4. Esquema general de la vía del reciclado de purinas.....	10
Figura 5. Producción de hipoxantina (HX) y ribosa 1-fosfato por actividad enzimática de purina nucleósido fosforilasa (PNP).....	11
Figura 6. Esquema del sistema circulatorio de la aleta caudal del tursión.....	22
Figura 7. Reacciones enzimáticas para la producción de N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinonamonoimina, por actividades enzimáticas de purina nucleósido fosforilasa (PNP) y xantina oxidasa (XO).....	25
Figura 8. Producción de ácido úrico por actividad enzimática de xantina oxidasa (XO)	26
Figura 9. Producción de inosina monofosfato (IMP) por la actividad enzimática de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT).....	27
Figura 10. Actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP) en eritrocitos de tursión y humano	33
Figura 11. Actividad de xantina oxidasa (XO) en plasma de tursión y humano	34
Figura 12. Actividad de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) en eritrocitos de tursión y humano	35
Figura 13. Actividad de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) en eritrocitos de humano y tursión	36
Figura 14. Actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP) de humano con distintos volúmenes de eritrocitos	73
Figura 15. Actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP) de tursión con distintos volúmenes de eritrocitos	74

Figura 16. Cambio en la absorbancia por catálisis de xantina oxidasa (XO) en plasma de tursión y humano	75
Figura 17. Cambio en la absorbancia por catálisis de xantina oxidasa (XO) en eritrocitos de tursión y humano	76
Figura 18. Cambio en la absorbancia por catálisis de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) en eritrocitos de tursión y humano	77
Figura 19. Cambio en la absorbancia por catálisis de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) en plasma de tursión y humano	78
Figura 20. Cromatograma de una muestra representativa de tursión para la determinación de la actividad de IMPDH	79
Figura 21. Cromatograma de los estándares de purinas	83
Figura 22. Cromatograma de los metabolitos de purinas en eritrocitos de humano	84
Figura 23. Cromatograma de los metabolitos de purinas en eritrocitos de tursión.....	85
Figura 24. Cromatograma de los metabolitos de purinas en plasma de humano	86
Figura 25. Cromatograma de los metabolitos de purinas en plasma de tursión	86
Figura 26. Cromatograma de los metabolitos de purinas en músculo de humano	87
Figura 27. Cromatograma de los metabolitos de purinas en piel de humano ..	88
Figura 28. Cromatograma de los metabolitos de purinas en piel de tursión	88
Figura 29. Fotografía de mioblastos de humanos (10X) durante las técnicas de estandarización	90
Figura 30. Fotografía de mioblastos de humanos (10X) con una confluencia del 90%	91
Figura 31. Análisis de viabilidad y conteo celular de mioblastos de humano por tinción con azul de tripano.....	92

Lista de tablas

Tabla I. Actividad enzimática de purina nucleósido fosforilasa (PNP) en eritrocitos de distintas especies de mamíferos	14
Tabla II. Concentración de los metabolitos de purinas en eritrocitos de humanos y tursiones	37
Tabla III. Concentración de los metabolitos de purinas en plasma de humanos y tursiones	38
Tabla IV. Concentración de los metabolitos de purinas en músculo de humanos	38
Tabla V. Condiciones cromatográficas de la estandarización para la cuantificación de purinas	82

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GDP	Guanosina difosfato
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HX	Hipoxantina
IMP	Inosina monofosfato
IMPDH	Inosina monofosfato deshidrogenasa
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PNP	Purina nucleósido fosforilasa
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
XDH	Xantina deshidrogenasa
XMP	Xantosina monofosfato
XO	Xantina oxidasa
XOR	Xantina oxidoreductasa
XR	Xantina reductasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del buceo

Los mamíferos marinos, como los cetáceos y pinnípedos, pueden permanecer sumergidos bajo el agua por periodos de hasta 2 horas y a profundidades superiores a los 1000 m (LeBoeuf *et al.*, 1986; Crocker y Costa, 2002; Kooyman, 2002). En consecuencia a la suspensión de la ventilación (apnea) asociada al buceo, los niveles de oxígeno en sangre y tejidos disminuyen (hipoxia) sin que se presente daño celular o tisular (Noren *et al.*, 2001; Ramirez *et al.*, 2007; Zenteno-Savín *et al.*, 2012). La hipoxia se define como la deficiencia en la disponibilidad de los niveles de oxígeno en los tejidos (<150 mmHg de presión parcial de oxígeno (pO_2)) (Makarewicz, 1998; Mastropasqua *et al.*, 1998).

Durante el buceo, como consecuencia a la interrupción del intercambio de gases (oxígeno y bióxido de carbono) a nivel pulmonar, las principales reservas de oxígeno se distribuyen en sangre y músculo (Williams *et al.*, 1999). La respuesta al buceo reportada para vertebrados incluye reducción del ritmo cardíaco (bradicardia), vasoconstricción periférica, reducción del flujo sanguíneo (isquemia) hacia los tejidos, y el desvío del flujo de sangre y oxígeno hacia el sistema nervioso central (Andersen, 1966; Butler y Jones, 1997; Davis *et al.*, 2004). Inmediatamente después del buceo, el ritmo cardíaco se eleva (taquicardia) para restablecer el flujo sanguíneo (reperfusión) y los niveles adecuados de oxígeno a los tejidos (reoxigenación), así como para eliminar los

metabolitos acumulados como el CO₂ y el ácido láctico (Kooyman y Ponganis, 1998). Los mamíferos marinos desarrollaron características fisiológicas para tolerar los ciclos repetitivos de buceo. Estas adaptaciones incluyen mayor volumen sanguíneo, mayores niveles de hematocrito, mayores concentraciones de hemoglobina (Hb) en sangre y de mioglobina (Mb) en músculo (Elsner *et al.*, 1998; Kooyman y Ponganis, 1998; Elsner, 1999; Kanatous *et al.*, 2002).

Los ciclos de isquemia/reperfusión pueden aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual, potencialmente se relaciona a un estado de estrés oxidativo (Elsner *et al.*, 1995; Zenteno-Savín *et al.*, 2012). Durante los eventos de isquemia la disminución de adenosina trifosfato (ATP) deriva en la acumulación de metabolitos de desecho de purinas y la conversión proteolítica de xantina deshidrogenasa (XDH) a xantina oxidasa (XO) (Elsner *et al.*, 1999, Zenteno-Savín *et al.*, 2012).

1.2 Generalidades del tursión (*Tursiops truncatus*)

El tursión (*Tursiops truncatus*) es una especie polimórfica; su talla, coloración y características craneales están relacionadas a su alimentación (Wells y Scott, 1999). Es una especie cosmopolita de aguas tropicales y templadas que, generalmente, se encuentra en aguas oceánicas y costeras con temperaturas superficiales entre 10 y 32°C. El límite de distribución de los tursiones está relacionado a la temperatura del agua y la localización de sus

presas (Wells y Scott, 1999). Los adultos alcanzan una talla de 2 a 3.8 m, tienen un cuerpo robusto y coloración oscura, la aleta dorsal es moderadamente curva (Wells y Scott, 1999). En general, bucean por periodos de 20 s a 10 min y a profundidades de 4 a 700 m (Lockyer y Morris, 1987; Klatsky *et al.*, 2007). Los buceos de corta duración les permiten nadar de un modo más activo y veloz, en comparación con otros mamíferos marinos que bucean durante periodos prolongados (Williams *et al.*, 1999).

1.3 Generalidades del humano

La mayoría de los mamíferos terrestres tienen poca tolerancia a cambios en los niveles de oxígeno. Los humanos, por ejemplo, pueden perder la conciencia si el cerebro permanece sin oxígeno de 15 a 20 s, y se sofocan si la ventilación se interrumpe durante 3-4 min (Andersen, 1966; Ramirez *et al.*, 2007). Existen diversas actividades en las que los humanos están expuestos a eventos de hipoxia e isquemia/reperfusión. Entre éstas se incluye el buceo sin aparatos o equipo (buceo libre), que se practica con fines de subsistencia o recreación. De manera similar a lo que ocurre con los tursiones, los procesos de hipoxia pueden presentarse durante y después del buceo. El buceo puede exponer a un individuo a riesgos fisiológicos debido a efectos tóxicos por la acumulación de nitrógeno, la enfermedad de descompresión, e incrementos de presión en cavidades aéreas por expansión de gases (Kooyman y Andersen, 1969; Lindholm y Lundgren, 2009). Existen excepciones en cuanto a la

duración y profundidad tolerables para cada individuo. Los buceadores de perlas pueden descender a más de 30 m de profundidad en buceos que, en promedio, duran 1 min (Kooyman y Andersen, 1969; Lindholm y Lundgren, 2009). Los buceadores entrenados pueden bucear durante más de 10 min aguantando la respiración en una alberca (apnea estática) y permanecer sumergidos hasta 4.24 min a profundidades de 214 m (Lindholm y Lundgren, 2009). A diferencia de lo que sucede en mamíferos marinos, los buceos consecutivos en humanos están asociados a enfermedades de descompresión y alucinaciones (Kooyman y Andersen, 1969). La respuesta al buceo en humanos, a diferencia de otros vertebrados y de los mamíferos marinos, es que la intensidad de los cambios en el sistema cardiovascular es más atenuada (Elsner *et al.*, 1999; Lindholm y Lundgren, 2009).

1.4 Hipoxia e isquemia/reperfusión

En los distintos grupos de vertebrados los eventos de hipoxia se presentan principalmente por tres causas; isquemia, disminución de la presión parcial de oxígeno en sangre (hipoxemia), y baja concentración de Hb en sangre (anemia) (Makarewicz, 1998). En las células musculares y epiteliales, los procesos de hipoxia/isquemia inducen un déficit energético debido al catabolismo de las reservas de ATP hacia otros metabolitos de purinas como adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina, inosina e hipoxantina (HX) (Fig. 1) (Rao *et al.*, 1990; Marro *et al.*, 1997). En las células

y los tejidos isquémicos de mamíferos terrestres y marinos se han reportado concentraciones elevadas de HX, metabolito que se considera un indicador de la degradación del ATP (Elsner *et al.*, 1999; Vázquez-Medina *et al.*, 2011).

Por otra parte, durante la isquemia, la activación de las enzimas NADPH oxidasas incrementan los niveles de calcio intracelular que, a su vez, activa proteasas citosólicas (Marro *et al.*, 1997; Silveira y Yoshida, 2004; Rathore *et al.*, 2008). Sin embargo, es durante el restablecimiento del flujo sanguíneo (reperfusión) que la célula puede sufrir daños irreversibles debido a la sobreproducción de ERO, respuestas inflamatorias, la activación de neutrófilos y alteraciones bioquímicas en general (Marro *et al.*, 1997; Peirce *et al.*, 2000; Silveira y Yoshida, 2004). Al finalizar un buceo, con el restablecimiento de los niveles de oxígeno (reoxigenación) y la perfusión, la XO induce la producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), utilizando al oxígeno molecular, la HX y xantina como sustratos (Marro *et al.*, 1997) (Fig. 1). Aun cuando se restablecen los niveles adecuados de oxígeno, los niveles de ATP pueden permanecer por debajo de los niveles basales durante horas o días (Silveira y Yoshida, 2004).

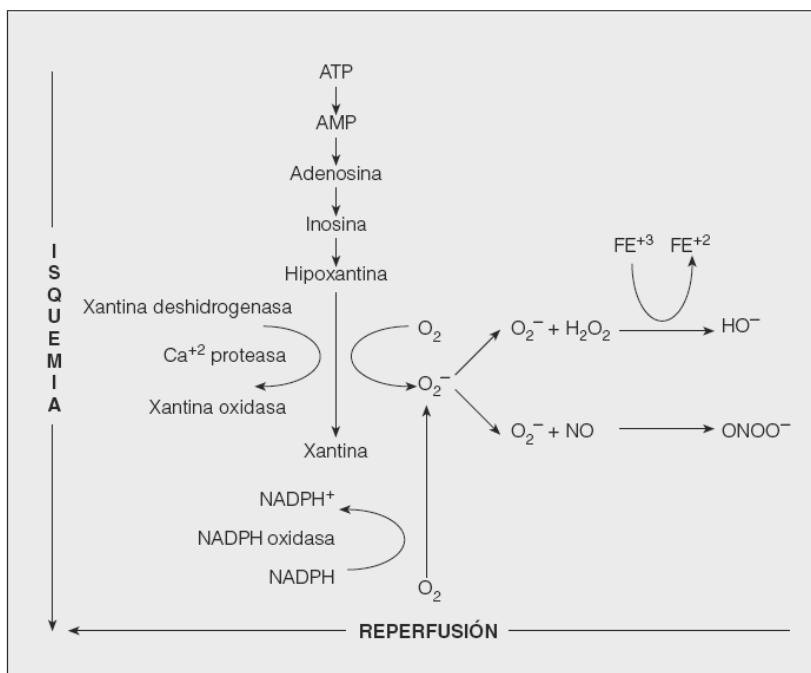


Figura 1. Catabolismo de la adenosina trifosfato (ATP) y producción de especies reactivas de oxígeno durante la isquemia/reperfusión. AMP, adenosina monofosfato; Ca, calcio; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; O_2^- , radical superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; FE, hierro; NO, óxido nítrico; $ONOO^-$, peroxinitrito; HO^- , radical hidroxilo; O_2 , oxígeno (Tomado de Padilla y Padilla, 2004).

Las aves y algunos mamíferos pueden tolerar condiciones de hipoxia aguda o crónica utilizando estrategias fisiológicas que disminuyen el metabolismo y previenen el daño celular o tisular, manteniendo así la integridad estructural y funcional de las células y tejidos (Ramirez *et al.*, 2007). La respuesta a los periodos de hipoxia e isquemia/reperfusión varía entre especies y tejidos. Por lo tanto, la tolerancia a la hipoxia en las distintas células depende, principalmente, de su habilidad para generar nucleótidos de adenina y del nivel de energía requerido para sus funciones físicas y bioquímicas (Makarewicz, 1998; Silveira y Yoshida, 2004).

1.5 Metabolismo de purinas

Los nucleótidos están formados por bases purínicas (adenina y guanina) o pirimídicas (timina, citosina, uracilo), una pentosa y uno o más grupos fosfato (Nelson y Cox, 2005). El metabolismo de purinas es un proceso esencial en la producción de los nucleótidos y ácidos nucleicos (Balinsky, 1972; Baranwska-Bosiacka *et al.*, 2004; Jurecka, 2009). Existen tres vías metabólicas para la síntesis y degradación de nucleótidos de purinas, la síntesis *de novo*, la del reciclado y la del catabolismo (Stout y Caskey, 1985; Nelson y Cox, 2005; Jurecka, 2009). Se estima que la vía de la síntesis *de novo* de purinas aporta aproximadamente el 0.4% de los nucleótidos requeridos por las células (Nelson y Cox, 2005; Jurecka, 2009). Por lo tanto, la vía de reciclado de purinas es un mecanismo importante para la regeneración de reservas de nucleótidos de adenina y guanina, lo cual es relevante después de un evento de hipoxia e isquemia/reperfusión (Ely y Berne, 1992).

1.5.1 Vía de la síntesis *de novo*

La vía de la síntesis *de novo* comienza con la producción de 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) a partir de ribosa-5-fosfato y ATP, la reacción es catalizada por la enzima PRPP sintetasa (Moriwaki *et al.*, 1999; Jancso *et al.*, 2001). El PRPP es un acarreador energético importante que, a través de 10

reacciones enzimáticas subsecuentes, es convertido a inosina monofosfato (IMP) (Bzowska *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2006) (Fig. 2).

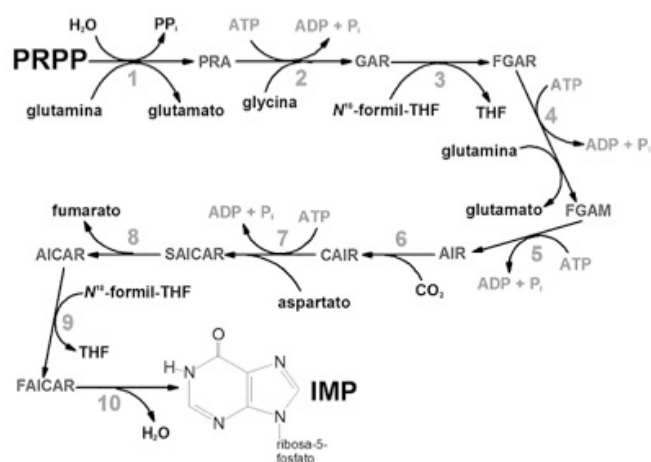


Figura 2. Producción de inosina monofosfato (IMP) a partir de 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP). (1) PRA, glutamina fosforribosil pirofosfato amidotrasferasa; (2) GAR, glicinamida ribonucleótido; (3) FGAR, α -N-formilglicina ribonucleótido; (4) FGAM, α -N-formilglicinamidina ribonucleótido; (5) AIR, 5'-aminoimidazol ribonucleótido; (6) CAIR, 4-carboxi-5-aminoimidazol ribonucleótido; (7) SAICAR, N-succino-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido; (8) AICAR, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido; (9) FAICAR, N-formilamino-imidazol-4-carboxamida ribonucleótido; (10) síntesis del anillo de purina de la inosina monofosfato. H₂O, agua; PPi, pirofosfato inorgánico; ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; Pi, fosfato inorgánico; THF, tetrahidrofolato (Tomado de www.themedicalbiochemistrypage.org).

El IMP es el precursor de la AMP y guanosina monofosfato (GMP) (Nelson y Cox, 2005; Murray *et al.*, 2006). En la síntesis *de novo*, la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) cataliza la conversión de IMP a xantosina monofosfato (XMP) en una reacción que utiliza nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) como cofactor (Ignoul y Eggermont, 2005; Hendstrom, 2009) (Fig. 3). La XMP es transformada a GMP por medio de aminación reductora y, posteriormente, por fosforilaciones consecutivas se forma la

guanosina trifosfato (GTP) (Montero *et al.*, 1995; Glander *et al.*, 2001; Ignoul y Eggermont, 2005; Hendstrom, 2009). En mamíferos existen 2 isoformas de la enzima IMPDH; la tipo I se expresa en las células bajo condiciones basales, mientras que la expresión de la tipo II se asocia a condiciones neoplásicas (Ignoul y Eggermont, 2005).

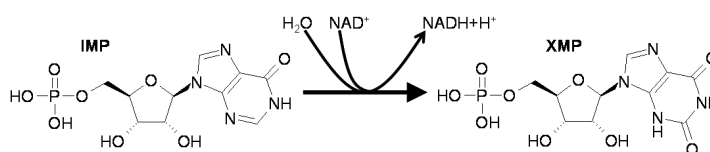


Figura 3. Producción de xantosina monofosfato (XMP) por la actividad enzimática de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) a partir de inosina monofosfato (IMP). H₂O, agua; NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleótido; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido reducido; H⁺, ión hidruro (Tomada de www.novocib.com).

1.5.2 Vía de reciclado de purinas

La vía de reciclado de purinas aprovecha los metabolitos derivados del catabolismo de las purinas incorporadas en la dieta y de los fragmentos de ácidos nucleicos de células que han sufrido muerte celular programada (apoptosis) (Nelson y Cox, 2005; Jurecka, 2009). Esta vía es energéticamente menos costosa y, en condiciones normales, hasta el 90% de las purinas son sintetizadas a través de este mecanismo (Nelson y Cox, 2005; Jurecka, 2009).

Al igual que en la vía de la síntesis *de novo*, en la vía de reciclado de purinas se sintetiza IMP, el cual es deaminado para formar AMP y GMP (Ely y Berne, 1992; Marro *et al.*, 1997) (Fig. 4). La enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) es esencial para la producción de IMP y GMP a partir de HX y guanina, respectivamente (Moriwaki *et al.*, 1999) (Figs. 4 y 9). Esta enzima se localiza en el citosol y es dependiente de Mg^{+2} (Dudzinska *et al.*, 2006).

Vía de reciclado de purinas

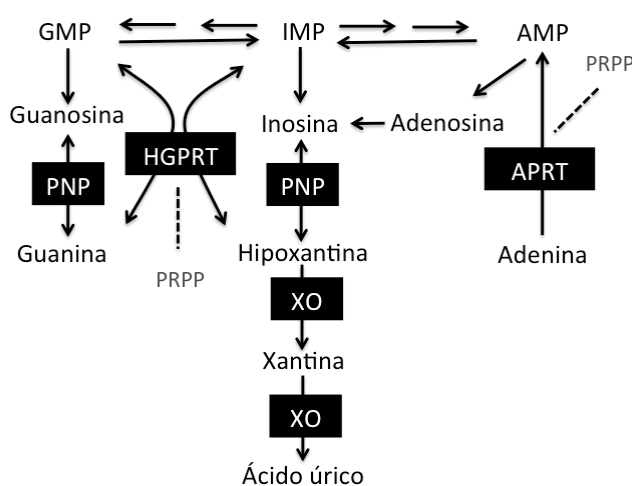


Figura 4. Esquema general de la vía del reciclado de purinas. GMP, guanosina monofosfato; IMP, inosina monofosfato; AMP, adenosina monofosfato; PNP, purina nucleósido fosforilasa; HGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa; XO, xantina oxidasa; APRT, adenina fosforibosil transferasa; PRPP, 5-fosforibosil-1-pirofosfato (Modificado de Torres y Puig, 2007).

La enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP) cataliza la reacción reversible de nucleósidos de purina y fosfato inorgánico; por ejemplo, inosina a HX (Fig. 5) y guanosina a guanina (Chu *et al.*, 1989; Nelson y Cox, 2005; Dudzinska *et al.*, 2006).

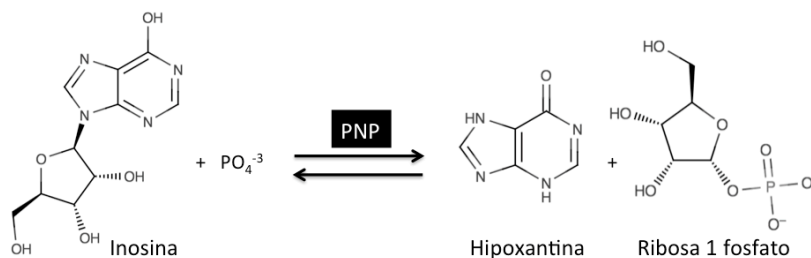


Figura 5. Reacción enzimática de la enzima purina nucleósido fosforilasa (PNP) para producir hipoxantina y ribosa 1-fosfato a partir de inosina. PO_4^{3-} , ión fosfato. (Modificado de Zanchi *et al.*, 2010).

La PNP se considera una enzima citosólica, aunque también se ha reportado su localización en mitocondrias (Moriwaki *et al.*, 1999; Toro *et al.*, 2006). Esta enzima se distribuye en la mayoría de los tejidos humanos, aunque su mayor actividad y abundancia se encuentra en los riñones, en granulocitos de sangre periférica y en tejidos linfoides (Moriwaki *et al.*, 1999; Bzowska *et al.*, 2000).

1.5.3 Catabolismo de purinas

La enzima XO cataliza los pasos finales de la degradación de purinas (Fig. 8); esto es, la oxidación de HX a xantina, y de esta última a ácido úrico (Fox, 1981, Moriwaki *et al.*, 1999). La localización extensiva de XO en los tejidos sugiere distintas funciones, incluyendo su participación como una barrera protectora contra infecciones bacterianas al producir O_2^- y ácido úrico; la actividad de esta enzima también está relacionada con procesos de proliferación y diferenciación celular (Fox, 1981; Moriwaki *et al.*, 1999; Nelson y Cox, 2005). En los humanos y otros mamíferos primates el ácido úrico es el

producto final del metabolismo de purinas, sin embargo, en el resto de los mamíferos la enzima uricasa cataliza la conversión de ácido úrico a alantoína (Skinner *et al.*, 2006).

2. ANTECEDENTES

De manera general, las comparaciones entre el metabolismo de los eritrocitos de tursiones y de humanos describen resultados similares (Harkness y Grayson, 1969). Específicamente en cuanto al metabolismo de purinas, Harkness y Grayson (1969) reportan que los eritrocitos de ambas especies tienen niveles comparables de adenina y nucleótidos de adenina (AMP, ADP y ATP). En cambio, los niveles de NAD^+ son 5 veces mayores en los eritrocitos de tursión que en los de humanos, y el NADP es menor en tursiones que en humanos (Harkness y Grayson, 1969). En el tursión la actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6DPH) es mayor que en el humano (Harkness y Grayson, 1969). Lo anterior sugiere que un porcentaje significativo de glucosa es utilizado por la vía de la pentosa fosfato, que tiene como objetivo primordial la producción de nucleótidos y ácidos nucleicos (Harkness y Grayson, 1969).

Los tejidos de los mamíferos marinos tienen distintas capacidades para tolerar y responder a los episodios de isquemia durante el buceo. Durante el buceo, el riñón de la foca anillada (*Phoca hispida*) se somete a isquemia

prolongada y vasoconstricción severa, mientras que el corazón está expuesto a isquemia/reperfusión de manera intermitente (Elsner *et al.*, 1998). Tanto en el riñón como en el corazón de la foca anillada y la foca arpa (*Phoca groenlandica*), las concentraciones de HX (indicador de la degradación de ATP) incrementan en respuesta a isquemia experimental (35°C durante 30 min *in vitro*), siendo mayor la acumulación de HX en el riñón que en el corazón (Elsner *et al.*, 1995; Elsner *et al.*, 1998). En los mismos tejidos de un mamífero terrestre, cerdo común (*Sus scrofa*), que no está adaptado a tolerar eventos de isquemia/reperfusión, los niveles de HX aumentan en respuesta a isquemia por encima de los niveles encontrados en los tejidos de foca anillada (Elsner *et al.*, 1998). La integración de los resultados de estos estudios sugieren que los tejidos de foca anillada acumulan menos HX al reciclar ATP a través de la vía IMP-HGPRT (Elsner *et al.*, 1998; Elsner *et al.*, 1999). La capacidad de reciclar los metabolitos intermediarios del ATP podría reducir el costo metabólico de producir ATP *de novo*. Los pulmones de las focas anilladas metabolizan purinas bajo situaciones de isquemia debido a que, después de una inyección de HX en la circulación venosa, no se detectó la presencia de este metabolito en sangre arterial (Elsner *et al.*, 1998).

En relación a la vía del reciclado de purinas, Craik *et al.* (1997) reportaron que la actividad de PNP en eritrocitos de tursiones es menor que en humanos y conejos, pero similar a la de ratas (Tabla I). Aunque los eritrocitos del tursión son permeables a purinas, pirimidinas, y D-glucosa como los de

humano, la menor actividad de PNP para metabolizar la inosina indica que ésta no es una de las principales fuentes metabólicas *in vivo* para los eritrocitos del tursión, a diferencia de lo que ocurre en el cerdo, en donde la inosina es un aporte importante de energía metabólica (Craik *et al.* 1997). En los tursiones, la producción de adenosina en el hígado y su subsecuente incorporación y aprovechamiento en los eritrocitos podría contribuir a mantener los niveles adecuados de nucleótidos de purinas (Craik *et al.* 1997).

Tabla I. Actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP) en eritrocitos de mamíferos. Datos normalizados a la actividad de la enzima en lisados de eritrocitos de humanos (Modificado de Craik *et al.*, 1997).

Organismo	Actividad de PNP en eritrocitos de humanos (%)
Conejo	115.1
Rata	10.6
Delfin	7.4

Los elefantes marinos del norte (*Mirounga angustirostris*) están expuestos a niveles críticos de isquemia e hipoxemia durante las apneas del buceo y del sueño (Kooyman y Ponganis, 1998; Vázquez-Medina *et al.*, 2011). En el plasma de las crías de elefantes marinos del norte, durante las apneas y durante la reoxigenación, hay un incremento en la actividad de XO y la acumulación de xantina e HX, aunque sin evidencia de daño oxidativo (Vázquez-Medina *et al.*, 2011). En el músculo de las crías de elefantes marinos del norte, la actividad de XO se incrementa 25% después de un periodo de apnea, sugiriendo que en este tejido se puede generar daño oxidativo por el aumento en la producción de ERO a través de la reacción HX-XO (Vázquez-

Medina *et al.*, 2011). Los periodos prolongados de isquemia pueden provocar lesiones en los tejidos e incluso necrosis; sin embargo, las apneas repetidas que forman parte del modo de vida de los elefantes marinos del norte aparentemente estimulan la protección contra las condiciones perjudiciales de la hipoxia, estos intervalos cortos de isquemia/reperfusión (pre-acondicionamiento) podrían contribuir a atenuar el daño por reperfusión en músculo (Vázquez-Medina *et al.*, 2011).

En el músculo cardiaco (miocardio) de perros, el pre-acondicionamiento (4 episodios de isquemia durante 5 min seguidos de reperfusión por 5 min) disminuye la tasa de infartos provocados por un subsecuente periodo prolongado (40 min) de isquemia (Murry *et al.*, 1986). Aparentemente, la reperfusión de manera intermitente es suficiente para eliminar el exceso de las purinas acumuladas durante los periodos prolongados de isquemia (Murry *et al.*, 1990). Los procesos de isquemia en el músculo cardiaco tienen como consecuencia el incremento en las concentraciones de IMP, adenosina, inosina e HX. Durante la reperfusión las concentraciones de HX e inosina disminuyen a niveles basales; sin embargo, los niveles de ATP se mantienen bajos y no alcanzan nuevamente los niveles basales (Carlucci *et al.*, 1998).

La vía de reciclado de purinas es relevante bajo circunstancias que incrementan la degradación de nucleótidos, como el ayuno o la apnea del sueño, los cuales son parte de la historia natural del elefante marino del norte

(Kooyman y Ponganis, 1998; Elsner *et al.*, 1999; Soñanez-Organis *et al.*, 2012). En las crías de elefante marino del norte, el ayuno prolongado incrementa el reciclado de purinas, principalmente por aumento de la actividad de HGPRT (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). De manera general, la concentración de xantina e HX, la expresión génica y actividad de HGPRT y de XR incrementan con la duración del ayuno (hasta 7 semanas) (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). En el tejido adiposo y músculo, durante las últimas dos semanas de ayuno, la expresión génica de HGPRT incrementa hasta 4 veces; en plasma, las concentraciones de xantina e HX incrementan 3 y 2.5 veces, respectivamente (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). La expresión génica de XR incrementa 3 veces en tejido adiposo, pero disminuye hasta 22 veces en músculo (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). Lo anterior sugiere que la respuesta a los episodios de isquemia/reperfusión en mamíferos marinos es específica para cada tejido. En los elefantes marinos del norte el ayuno prolongado incrementa la capacidad de reciclar purinas, esta respuesta adaptativa aparentemente contribuye a suplir el ATP requerido para el adecuado funcionamiento de los tejidos (Soñanez-Organis *et al.*, 2012).

Existen reportes de litiasis renal en tursiones, los cálculos renales principalmente están conformados por uratos de amonio (Smith *et al.*, 2014). Smith *et al.* (2014) reportan un incremento en la excreción de ácido úrico, sulfatos y amonio en la orina después de que los tursiones son alimentados con pescado. Los resultados sugieren que los tursiones en cautiverio son

susceptibles a presentar litiasis renal por uratos de amonio como consecuencia de una dieta rica en purinas.

En humanos existen diversas patologías asociadas a las alteraciones del metabolismo de purinas, incluyendo la gota, hiperuricemia, desordenes inmunológicos, anormalidades neurológicas y depresión severa (Curto *et al.*, 1998). En la gota, la deficiencia en la actividad de HGPRT está relacionada al aumento en la concentración de ácido úrico en tendones, articulaciones y riñones (Fox, 1981; Curto *et al.*, 1998). El síndrome de Lesch-Nyhan, propiciado por la nula o baja actividad de la enzima HGPRT, se caracteriza por concentraciones elevadas de ácido úrico en sangre (hiperuricemia), retraso mental, automutilación y desórdenes neurológicos que provocan espasmos musculares y movimientos involuntarios (Lesch y Nyhan, 1964; Curto *et al.*, 1998). La acumulación de xantina en sangre (xantinuria) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que afecta principalmente a varones; la deficiente actividad de la XO provoca incrementos en las concentraciones de xantina e HX (Fox, 1981). Además, el incremento y la acumulación de las purinas provoca una alta excreción de xantina en la orina, y puede provocar nefropatías y fallas renales (Levartovsky *et al.*, 2000).

En cultivos de piel de pacientes con síndrome de Lesch-Nyhan la concentración de PRPP fue 4 veces mayor en individuos con deficiencia en HGPRT en comparación con individuos sanos. Se ha sugerido que en los individuos con síndrome de Lesch-Nyhan se acelera la síntesis *de novo* como

un mecanismo compensatorio para la síntesis de purinas (Rosenbloom *et al.*, 1968). En fibroblastos de pacientes con gota se reportó la misma tendencia al medir la concentración de fosforibosil N-formilglicinamida y PRPP (Henderson *et al.*, 1968).

Con base en lo anterior, en este proyecto se propuso comparar el metabolismo de purinas entre un mamífero marino adaptado a ciclos de hipoxia/reoxigenación e isquemia/reperfusión (tursión) con un mamífero terrestre (humano).

3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento del metabolismo de purinas en mamíferos marinos es escaso, sin embargo, es posible evidenciar diferentes estrategias para satisfacer los requerimientos de purinas en los tejidos expuestos a hipoxia e isquemia. Los resultados de este trabajo permitirán inferir diferencias en el metabolismo de las purinas entre un organismo adaptado a ciclos de hipoxia/reoxigenación e isquemia/reperfusión (tursión) y un organismo en el cual tales procesos resultan patológicos (humano). La evidencia recolectada en esta investigación puede ser utilizada como herramienta de diagnóstico en la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas al metabolismo de purinas en humanos.

4. HIPÓTESIS

Los mamíferos marinos pueden estar expuestos a hipoxia/reoxigenación durante los ciclos de buceo. Durante la hipoxia hay degradación de ATP y acumulación de productos de desecho del metabolismo de purinas (HX, xantina y ácido úrico). Sin embargo, se ha reportado que la acumulación de purinas no reciclables es menor en los tejidos de mamíferos marinos en comparación con los de mamíferos terrestres. Por lo anterior, se anticipa una mayor capacidad para reciclar y evitar la acumulación de purinas en los tursiones con respecto a los humanos. Ello supondría una adaptación del metabolismo de purinas para tolerar los ciclos de hipoxia/reoxigenación asociados al buceo.

5. OBJETIVO

Comparar la actividad enzimática y la concentración de los principales indicadores del metabolismo de purinas en sangre (plasma y eritrocitos), piel y músculo de tursiones y humanos.

5.1 Objetivos particulares

Determinar la actividad de las principales enzimas involucradas en el metabolismo de purinas (PNP, XO, HGPRT e IMPDH) en plasma y eritrocitos de tursiones y de humanos.

Cuantificar el contenido de los principales metabolitos de la síntesis, reciclado y degradación de purinas (HX, xantina, ácido úrico, IMP, inosina, NAD⁺, adenosina, AMP, GDP, ADP, GTP y ATP) en plasma, eritrocitos y piel de tursión y de humano, además de sus concentraciones en músculo de humano.

Determinar la actividad de la enzima uricasa en plasma de tursiones.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta de muestras

Se colectaron 12 muestras de sangre periférica y 4 de piel de cada especie; adicionalmente, se colectaron 8 muestras de músculo esquelético de humanos. La fecha, identificador (ID), tejido, sexo, edad, peso, porcentaje de hematocrito y concentraciones de Hb se presentan en los anexos I y II. Las muestras de sangre periférica de tursiones se colectaron a partir de la vena primaria ramificante de la aleta caudal (Fig. 6). Las muestras de piel de tursión se colectaron mediante frotamiento cutáneo en la región cercana a la aleta caudal, y se colocaron en medio de transporte (medio Eagle modificado por Dulbecco 1X, L-glutamina 20 mM, piruvato de sodio 0.5 mM, suero cósmico bovino 1X, penicilina 10000 U y estreptomycinina 10000 µg y DMSO 10%). Todas las muestras fueron colectadas en condiciones de asepsia y con apoyo del

personal veterinario del delfinario de Cabo San Lucas (Baja California Sur, Cabo Dolphins). Las muestras de tejidos humanos se colectaron de voluntarios del Hospital Central de Especialidades Médicas de La Paz (La Paz, Baja California Sur), previo consentimiento informado y por escrito (Anexo III). Los criterios de exclusión para la colecta de muestras de humanos incluyen niveles de ácido úrico mayores a 7.2 mg dL^{-1} , diagnósticos de gota, diabetes, hiperuricemia, anemia.

Las muestras de sangre de humanos se colectaron por punción venosa de la región anterior del codo. Las muestras de piel y de músculo esquelético se colectaron de la región abdominal de pacientes intervenidas por cesárea debido a la accesibilidad a la toma de muestra y monitoreo médico continuo durante el embarazo. Las muestras se colocaron en un criovial y se transportaron en una hielera al laboratorio de Estrés Oxidativo del CIBNOR. Los tejidos se lavaron con PBS 1X y se disectaron en dos porciones. La primera se colocó en un criovial y se almacenó a -80°C . La segunda se colocó en medio de transporte (suficiente hasta cubrir el tejido) y se almacenó a -80°C .

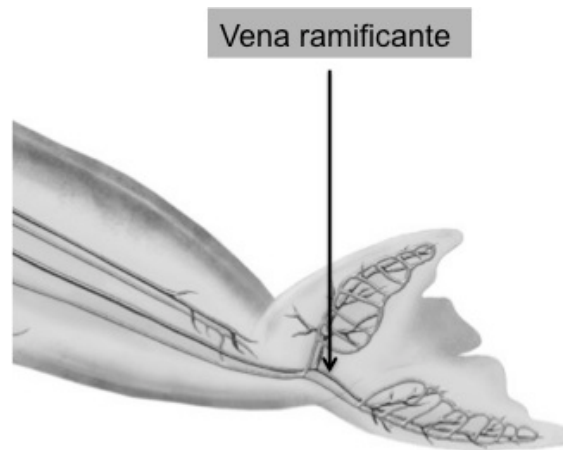


Figura 6. Esquema del sistema circulatorio de la aleta del tursión, señalando el sitio de toma de muestra sanguínea (Modificado de www.hpsanatomy.wikispaces.com).

6.2 Preparación de muestras sanguíneas

Las muestras de sangre periférica se colectaron en tubos Vacutainer© (7 mL) con EDTA como anticoagulante, para recuperar el plasma y eritrocitos. Las muestras se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 10 min en una centrífuga de campo (Mobilespin, Grandview, MO, USA). Se recuperó el plasma y se almacenó en crioviales (alícuotas). Se desechó la capa de leucocitos y se realizó el lavado de eritrocitos. Brevemente, se agregaron 2 volúmenes de solución salina 0.9% a 4°C y se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se descartó y se retiraron los leucocitos restantes. El procedimiento se repitió 2 o más veces (hasta retirar en su totalidad los leucocitos). Los eritrocitos se dividieron en alícuotas de aproximadamente 100 μL . Las muestras de sangre de los tursiones se procesaron en el laboratorio

veterinario del delfinario de Cabo Dolphins, se mantuvieron en frío y se transportaron al laboratorio de Estrés Oxidativo. Las muestras de sangre de humano se procesaron de la misma manera que las del tursión en el laboratorio de Estrés Oxidativo. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas por duplicado o triplicado, según los requerimientos metodológicos y la cantidad de muestra disponible.

6.3 Análisis bioquímicos y moleculares

6.3.1 Hematocrito y hemoglobina

El hematocrito, porcentaje de volumen que ocupan los glóbulos rojos en la sangre (Silva-García y García-Bermejo, 2004), se determinó por centrifugación capilar (1 mm de diámetro y 7 cm de longitud) utilizando una centrífuga de campo (Zipocrit, Tucker, Georgia). Las muestras fueron centrifugadas durante 5 min. El resultado se interpretó por inspección visual utilizando un patrón gráfico y se reportó en términos porcentuales (Silva-García y García-Bermejo, 2004). La determinación de hematocrito de los tursiones se realizó en el laboratorio veterinario del delfinario Cabo Dolphins. La determinación de Hb se realizó a partir del contenido intra-eritrocitario (lisados de eritrocitos). Los eritrocitos se lisaron con agua destilada fría y mediante 2 ciclos de congelamiento/descongelamiento, siguiendo el procedimiento descrito por Montero *et al.* (1995). Se utilizó un kit comercial por colorimetría (Cayman,

Chemical Company, MI, USA). Brevemente, las muestras se diluyeron 1:10 en agua destilada (dH₂O). Se preparó una curva estándar con Hb (concentraciones de 0 a 250 µM). Se utilizó una microplaca de 96 pozos y en cada uno se agregaron 20 µL de la muestra y 180 µL del detector de Hb. La reacción se incubó durante 15 min y se determinó su absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific, Finlandia). Los resultados se expresan en g dL⁻¹. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

6.4 Actividades enzimáticas

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

La actividad de la PNP se cuantificó utilizando el método indirecto reportado por Chu *et al.* (1989). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido por las reacciones secuenciales de las enzimas PNP y XO, oxida al ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico (DHBS) y 4-aminofenazona formando el producto N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinonamonoimina (colorante rojo) (Fig. 7). Este compuesto tiene un pico máximo de absorción a 512 nm, por lo que se puede monitorear por espectrofotometría (Jenway 6305, Princeton, NJ, USA). Brevemente, la solución amortiguadora de corrida (Na₃PO₄, 22 mM, pH 7.5; XO, 167 U L⁻¹; peroxidasa, 2000 U L⁻¹; 4-aminofenazona, 1.6 mM; ferrocianuro de potasio, 120 µM), se mezcló con

DHBS (8 mM) e inosina (12 mM). Se añadió la muestra a la solución de trabajo, y se registró el cambio en la absorbancia a partir de los 60 s y hasta los 180 s a 520 nm y 25°C. Los resultados se reportan en U de PNP mg^{-1} de proteína. Una unidad de actividad enzimática de PNP se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μM de inosina por minuto a 25°C.

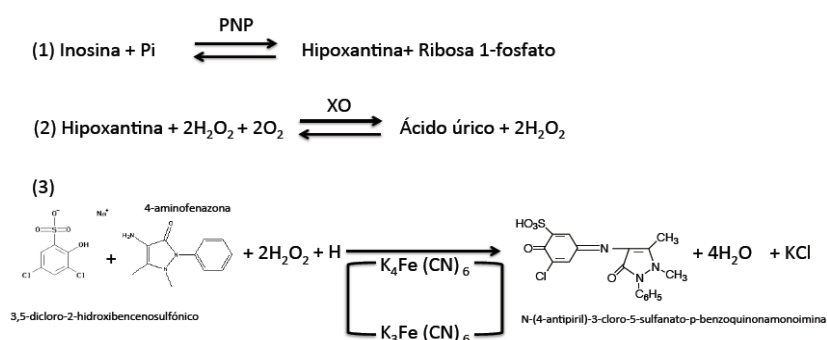


Figura 7. Esquema de reacciones para la producción del compuesto N-(4-antipiril)-3-cloro-5-sulfonato-p-benzoquinonamonoimina. La secuencia de reacciones involucra la participación de las enzimas purina nucleósido fosforilasa (PNP) y xantina oxidasa (XO). Pi, fosfato inorgánico; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; O_2 , oxígeno; H, hidrógeno; $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, ferrocianuro de potasio; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, ferricianuro de potasio; H_2O , agua; KCl, cloruro de potasio (Modificado de Chu *et al.*, 1989).

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

La actividad de la enzima XO se determinó utilizando un kit comercial (Amplex[®] Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay, Molecular Probes, Eugene, OR). La XO cataliza la oxidación de los nucleótidos de purina, HX o xantina, a ácido úrico y $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Borges *et al.*, 2002) (Fig. 8). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ es degradado a H_2O_2 , el cual, en presencia de peroxidasa de rábano, reacciona estequiométricamente con el reactivo Amplex[®] Red, produciendo resorufina, la cual tiene un máximo

de emisión entre 563 y 587 nm. La formación de resorufina se monitoreó por espectrofotometría en microplaca. Brevemente, se preparó una curva estándar de XO (0 a 10 mU mL⁻¹). La muestra se diluyó en solución de reacción (Tris-HCl, 0.5 mM). Se preparó en fresco la solución de trabajo (reactivo Amplex[®] Red; peroxidasa, 0.4 U mL⁻¹; HX o X) y se mezcló con la muestra. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min y se midió la absorbancia a 560 nm. La reacción se protegió de la luz en todo momento. El blanco se preparó de manera similar a las muestras excepto que no se añadió XO. Los resultados se reportan en mU de XO mL⁻¹. Una unidad de actividad enzimática de XO se define como la cantidad de enzima necesaria que cataliza la oxidación de xantina para producir 1 μM de ácido úrico por minuto a 25°C.

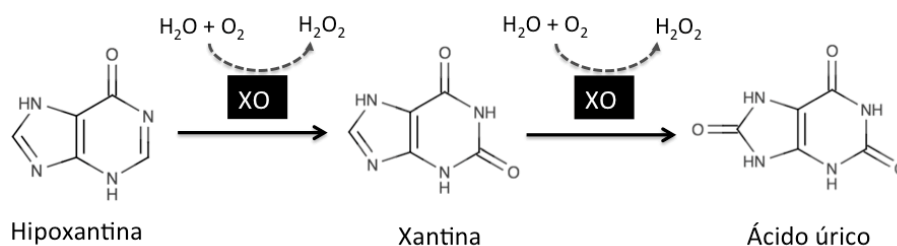


Figura 8. Producción de ácido úrico por la actividad enzimática de xantina oxidasa (XO) a partir de hipoxantina (HX) y xantina. H₂O, agua; O₂, oxígeno; H₂O₂, peróxido de hidrógeno (Modificado de www.caymanchem.com).

6.4.3 Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT, E.C. 2.4.2.8)

La actividad de la enzima HGPRT se determinó de manera indirecta al monitorear la tasa de producción de IMP utilizando un kit comercial (PRECISE[®] HPRT Assay, NovoCIB, Lyon, Francia). En presencia de IMPDH recombinante,

el IMP es oxidado a XMP que a su vez reduce el NAD a NADH (Balakireva y Godard, 2011, Nature Application Notes) (Fig. 9). La formación de NADH se monitoreó continuamente por medio de espectrofotometría en lector de microplaca a 340 nm durante 2 h a 37°C. Brevemente, se preparó una mezcla de reacción 1X con agua desionizada; solución amortiguadora de reacción 10X (proporcionada por el proveedor); DL-ditiotreitol (DTT, 1M); NAD⁺, 500 mM, IMPDH recombinante y PRPP, 0.5 mg. Como blanco se utilizó la misma reacción sin incluir PRPP. A cada pozo se le agregó la muestra y el volumen se ajustó a 200 µL, la microplaca se agitó durante 2 min. El cambio en la absorbancia se registró cada 5 min. Los análisis del blanco y la muestra se realizaron por duplicado. Los resultados de la actividad de HGPRT se reportan en nmol h⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Una unidad de actividad enzimática de HGPRT se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 µM de HX a IMP por minuto a pH 8.8 y 25°C.

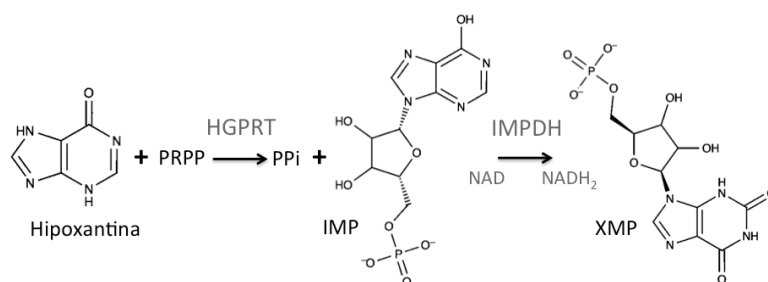


Figura 9. Reacción enzimática de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), para sintetizar inosina monofosfato (IMP) a partir de hipoxantina. PRPP, 5-fosforibosil-1-pirofosfato; P_i, fosfato inorgánico; NAD, nicotinamida adenina dinucleótido; IMPDH, inosina monofosfato deshidrogenasa; NADPH₂, nicotinamida adenina dinucleótido reducido; XMP, xantosina monofosfato (Modificado de Balakireva y Godard, 2011).

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

La actividad de IMPDH se determinó evaluando la conversión de IMP a XMP (Fig. 3) con base en la metodología reportada por Glander *et al.* (2001) utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa con detector de UV a 254 nm (Waters 2695, MA, USA). Los eritrocitos se lisaron por choque osmótico con dH₂O y DTT, 4 mM (1:3 v/v). La mezcla de reacción (IMP, 1 mM; NAD⁺, 0.5 mM; Na₃PO₄, 40 mM; KCl, 100 mM; pH 7.4) se incubó con 50 µL de muestra durante 2.5 h a 37°C. La reacción se detuvo con ácido perclórico (HClO₄, 4 M). La mezcla se centrifugó a 15800 × *g* durante 2 min y se congeló por 30 min a -80°C. Se descongeló y centrifugó bajo las condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µM, (SLGVR04NL, Millipore Int, Bedford, MA, USA) y se transfirió a viales de inyección para HPLC. Todas las muestras se analizaron inmediatamente.

La muestra se inyectó en una columna de 250 mm x 3.1 mm Prontosil 120-5 ODSAQ (Bischoff Chromatography, Leonberg, Alemania). La fase móvil consistió en un gradiente binario a partir de 100% de solución amortiguadora A (KH₂PO₄, 100 mM; tetrabutilamonio hidrógeno sulfato, 6 mM; pH 6.0) a 100% de solución amortiguadora B (solución amortiguadora A con 30% de metanol; pH 6.0) a flujo constante de 1.2 mL min⁻¹. La detección se determinó por luz UV a 254 nm. La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de XMP en un intervalo de concentraciones de 0.39 a 50 µM. La actividad de IMPDH se

reporta en $\text{nmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Una unidad de actividad enzimática de IMPDH se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de $1 \mu\text{M}$ de IMP a XMP por minuto a 37°C .

6.4.5. Uricasa (E.C. 1.7.3.3)

La actividad de uricasa se determinó utilizando el kit comercial Amplex Red Uric Acid/Uricase Assay (Molecular Probes, Eugene, OR) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó una curva estándar de uricasa (0 a 10 mU mL^{-1}). Las muestras se diluyeron ($1:2$ v/v) en solución amortiguadora de reacción 1X (Tris-HCl, pH 7.5). La solución de trabajo (Amplex[®] Red; peroxidasa de rábano, 0.4 U mL^{-1} ; uricasa, 0.4 U mL^{-1} ; solución amortiguadora de reacción 1X) se preparó en fresco y se mezcló con la muestra. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min, protegiéndola de la luz. La fluorescencia se midió a una longitud de excitación de 530 nm y una longitud de emisión de 590 nm. Como control positivo se utilizó H_2O_2 ($10 \mu\text{M}$). Una unidad de uricasa se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir $1 \mu\text{mol}$ de ácido úrico en alantoína a 25°C y pH 8.5.

6.5. Proteínas totales

Para estandarizar los resultados de las actividades enzimáticas de las muestras de plasma, eritrocitos y músculo se cuantificó la concentración de proteínas totales utilizando el kit de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, E.U.A) adaptado a microplaca. El ensayo se basa en el método descrito por Bradford (1976). Se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (ASB) en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.2 mg mL⁻¹. Las muestras se diluyeron en distintos volúmenes de dH₂O dependiendo de cada tejido. En cada pozo de la microplaca se mezclaron dH₂O, colorante de Bradford y la muestra o albúmina en el caso de la curva estándar. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 min y se leyó la absorbancia a 620 nm. Los resultados se expresan en mg de proteína mL⁻¹.

6.6. Concentración de los metabolitos de las purinas

Las concentraciones de HX, xantina, ácido úrico, IMP, inosina, NAD⁺, adenosina, AMP, GDP, ADP, GTP y ATP se cuantificaron utilizando HPLC por pares iónicos, con base en las metodologías propuestas por Stocchi *et al.* (1987), Ally y Park (1992) y Giannattasio *et al.* (2003). Brevemente, las muestras de eritrocitos se trataron con HClO₄ (0.5 M) y etilen-glicol-bis del ácido tetracético (EGTA, 0.5 mM), se agitaron vigorosamente en un vortex y se mantuvieron en baño de hielo por 20 min. Se centrifugaron a 17900 × *g* durante

15 min a 4°C, el sobrenadante se neutralizó con un volumen de carbonato de potasio (K_2CO_3 , 0.5 M) y KH_2PO_4 (1 mM), y las muestras se incubaron por 15 min en un baño de hielo. El perclorato de potasio ($KClO_4$) formado se precipitó por centrifugación a $17900 \times g$. La muestra se filtró a través una membrana de nylon (0.22 μm) y se inyectó en una columna Supelcosil LC-18 (150 x 4.6 mm, 3 μm tamaño de partícula, Sigma-Aldrich/Supelco, USA). Las muestras de plasma se centrifugaron en tubos Amicon® Ultra-4 (50 kDa de corte, Millipore, Irlanda) durante 20 min a 4°C y se analizaron sin ningún tratamiento adicional. El músculo y la piel se homogeneizaron con $HClO_4$ (0.5 M) manteniéndose en frío, se incubó 10 min en hielo y se centrifugó a $10000 \times g$, posteriormente siguieron las mismas condiciones que para eritrocitos. Como fase móvil se utilizaron las mismas soluciones amortiguadoras y condiciones que para la determinación de IMPDH, excepto la sustitución de metanol por acetonitrilo y un flujo constante de 1.1 mL min^{-1} . Se preparó una curva de calibración (0.39 a 100 μM) incluyendo a cada uno de los analitos de interés en una solución amortiguadora de KH_2PO_4 (0.1 M, pH 6.5). La señal se analizó por medio de HPLC con un detector de UV a 254 nm. El análisis cuantitativo se calculó comparando el área de los picos identificados en las muestras con el área de los estándares inyectados a concentración conocida. Los resultados se reportan en $\mu M \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

6.7. Análisis estadístico

A cada grupo de datos se les aplicaron las pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (Levene) (Zar, 2009). Dado que los datos presentaron una distribución no normal, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para determinar las diferencias significativas entre las especies (Zar, 2009). Los resultados se reportan como las medianas y los percentiles (25 y 75), a menos que se indique lo contrario. En todos los casos, la significancia estadística es considerada cuando $p < 0.05$ (Zar, 2009). Los análisis estadísticos se desarrollaron utilizando los programas Statistica v.8 y SPSS v.21.

7. RESULTADOS

7.1 Hematocrito y hemoglobina (Hb)

La media \pm error estándar del hematocrito del tursión fue de 42.41 ± 3.51 %, y del humano fue de 39.5 ± 0.5 %. En promedio, la concentración de Hb en las muestras de sangre del tursión fue de 13.07 ± 1.13 g dL⁻¹ mientras que en humanos fue de 11.79 ± 0.48 g dL⁻¹.

7.2. Actividades enzimáticas

7.2.1. Purina nucleósido fosforilasa (PNP)

La actividad de PNP en eritrocitos de humanos fue mayor ($p = 0.001$) que en eritrocitos de tursiones (Fig. 10). En el plasma de ambas especies la actividad de esta enzima estuvo por debajo del límite de detección.

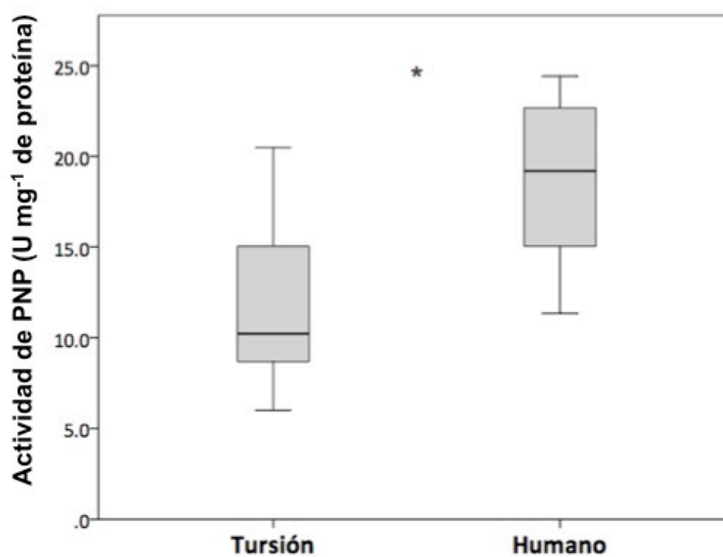


Figura 10. Actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP) en eritrocitos de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los resultados se expresan en unidades (U) de PNP mg^{-1} de proteína. Los datos se presentan como mediana \pm 25-75%. * = diferencia significativa entre especies ($p < 0.05$).

7.2.2. Xantina oxidasa (XO)

La actividad de XO en eritrocitos no pudo determinarse debido a la interferencia del hierro de la Hb con los colorantes fluorescentes como el Amplex®Red (Molecular Probes, comunicación personal) (Anexo IV). La

actividad de XO en plasma no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras de plasma de tursión y de humanos (Fig. 11).

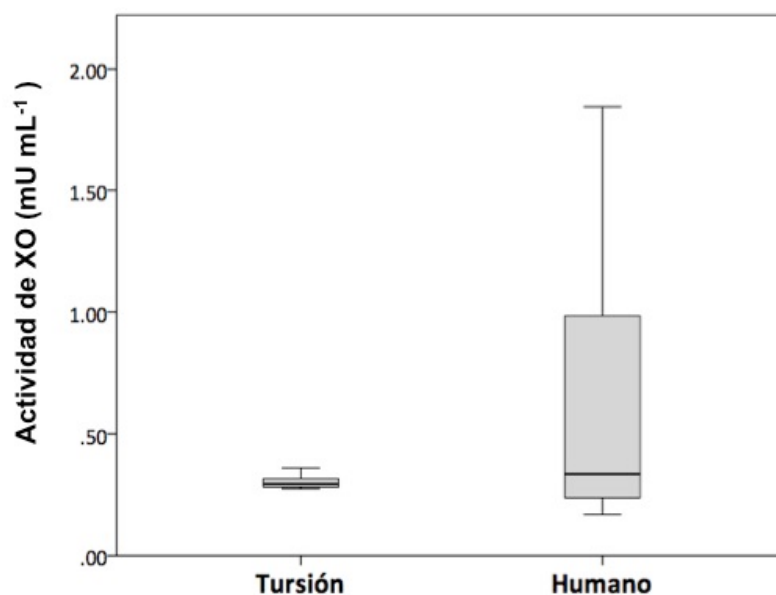


Figura 11. Actividad de xantina oxidasa (XO) en plasma de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los resultados se expresan en miliunidades (mU) mL⁻¹. Los datos se presentan como mediana \pm 25-75%.

7.2.3. Hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT)

La actividad de HGPRT fue significativamente mayor en los eritrocitos de humanos que de tursiones ($p = 0.01$; Fig. 12). En plasma de tursiones la actividad de HGPRT fue de 3.25 (1.23-3.95) nmol h⁻¹ mg⁻¹ de proteína. En plasma de humanos sólo en 5 individuos la actividad de HGPRT estuvo por encima del límite de detección (6.75 nmol h⁻¹ mL⁻¹).

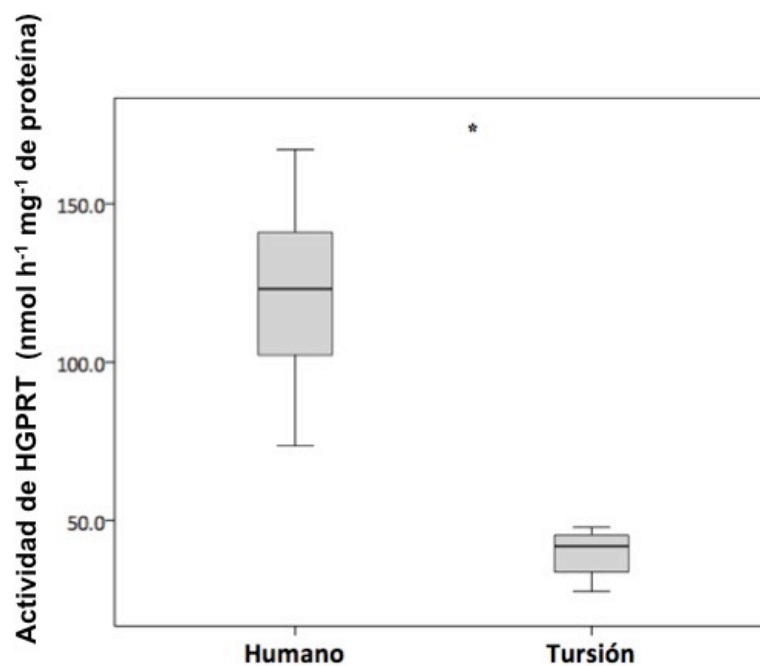


Figura 12. Actividad de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) en eritrocitos de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los resultados se expresan en $\text{nmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Los datos se presentan como mediana \pm 25-75%. * = diferencias significativas ($p < 0.01$).

7.2.4. Inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de IMPDH entre eritrocitos de tursiones y humanos ($p > 0.05$; Fig. 13).

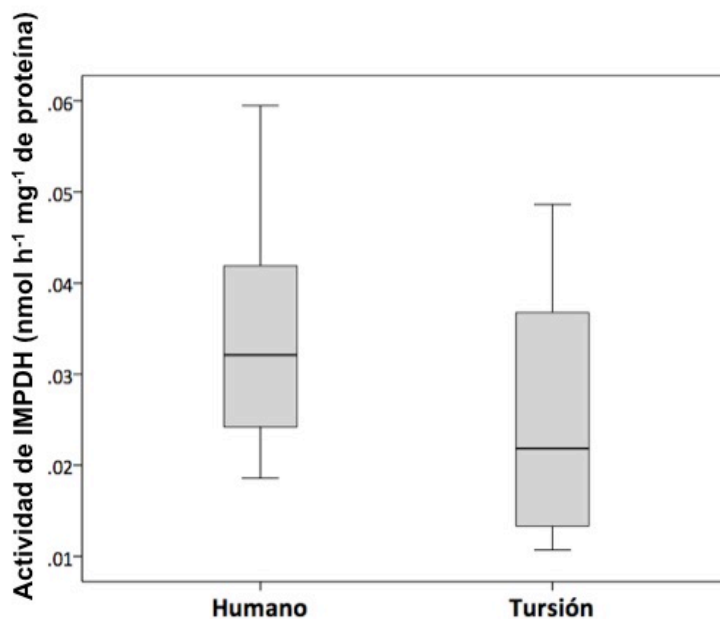


Figura 13. Actividad de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) en eritrocitos de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los resultados se expresan en $\text{nmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Los datos se presentan como mediana \pm 25-75%.

7.3. Concentración de los metabolitos de las purinas

Los cromatogramas obtenidos para las muestras de eritrocitos, plasma, músculo y piel a partir de los análisis por HPLC se encuentran en el anexo IV. En las muestras de eritrocitos de humanos se identificaron 7 metabolitos de purinas, HX, IMP, NAD^+ , AMP, ADP, GTP y ATP (Tabla II). En los eritrocitos de tursiones, además, se identificó el GDP. Las concentraciones de NAD^+ y AMP en eritrocitos de tursión fueron significativamente más altos que en eritrocitos de humanos ($p < 0.05$). Las concentraciones de HX, ADP, GTP y ATP fueron mayores en eritrocitos de humanos que en eritrocitos de tursiones ($p < 0.05$).

Tabla II. Concentración ($\mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína) de los metabolitos de purinas identificados en eritrocitos de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los datos se muestran como mediana (percentiles 25-75). El asterisco denota diferencias significativas entre especies ($p < 0.05$). ND = por debajo del límite de detección.

Metabolito	Tursión ($\mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína)	Humano ($\mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína)
HX	0.057 (0.051-0.084)	0.18 (0.11-0.24) *
IMP	0.18 (0.12-0.27)	0.07 (0.05-0.72)
NAD⁺	0.10 (0.89-3.42)*	0.004 (0.05-0.13)
AMP	0.37 (0.23-0.57)*	0.08 (0.07-0.17)
GDP	0.06 (0.05-0.07)	ND
ADP	0.24 (0.19-0.28)	0.31 (0.28-0.37) *
GTP	0.04 (0.03-0.05)	0.064 (0.061-0.090) *
ATP	0.09 (0.05-0.15)	0.84 (0.45-0.92) *

En las muestras de plasma de tursiones y humanos se identificaron 12 derivados del metabolismo de purinas (Anexo IV), HX, xantina, ácido úrico, IMP, inosina, NAD⁺, adenosina, AMP, ADP, GDP, GTP y ATP (Tabla III). Las concentraciones de HX e IMP fueron significativamente mayores en plasma de tursiones que en plasma de humanos ($p < 0.05$). Las concentraciones de ácido úrico, ADP, GTP y ATP fueron significativamente más altas en plasma de humanos que de tursiones ($p < 0.05$).

Tabla III. Concentración ($\mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína) de los metabolitos de purinas identificados en plasma de humanos y tursiones (*Tursiops truncatus*). Los datos se muestran como mediana (percentiles 25-75). El asterisco denota diferencias significativas entre especies ($p < 0.05$).

Metabolito	Tursión ($\mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína)	Humano ($\mu\text{M mg}^{-1}$ de proteína)
HX	0.33 (0.22-0.54)*	0.07 (0.04-0.14)
Xantina	0.22 (0.14-0.24)	0.28 (0.21-0.48)
Ácido úrico	0.44 (0.24-0.76)	7.01 (4.71-9.28) *
IMP	0.25 (0.15-0.38)*	0.12 (0.09-0.18)
Inosina	0.12 (0.09-0.17)	0.15 (0.09-0.26)
NAD ⁺	0.17 (0.10-0.25)	0.12 (0.07-0.18)
Adenosina	0.016 (0.015-0.017)	0.04 (0.02-0.11)
AMP	0.05 (0.04-0.06)	0.06 (0.05-0.12)
GDP	0.04 (0.03-0.05)	0.048 (0.043-0.056)
ADP	0.03 (0.02-0.04)	0.07 (0.06-0.10) *
GTP	0.043 (0.030-0.048)	0.05 (0.04-0.069) *
ATP	0.025 (0.017-0.033)	0.04 (0.03-0.05) *

En el músculo de humanos se determinaron las concentraciones de HX, IMP, inosina, NAD⁺, ADP, GTP y ATP (Tabla IV; Anexo IV). La adenosina y el GDP se identificaron únicamente en 3 muestras. Las concentraciones de xantina y ácido úrico estuvieron por debajo del límite de detección en todas las muestras.

Tabla IV. Concentración (μM) de los metabolitos de purinas identificados en el músculo de humanos. Los datos se muestran como mediana y percentiles (25-75).

Metabolito	Humano (μM)
HX	5.92 (3.85-7.00)
IMP	5.98 (4.52-9.95)
Inosina	30.09 (22.40-50.81)
NAD	2.83 (2.18-3.27)
AMP	0.34 (0.28-1.43)
ADP	17.65 (15.15-20.92)
GTP	1.72 (1.09-2.72)
ATP	26.46 (7.01-62.43)

En las muestras de piel de humano se identificaron 4 metabolitos de purinas (Anexo IV). Los metabolitos se encontraron cerca o por debajo del límite de detección. En las muestras de piel de tursión sólo se identificó el ADP (Anexo IV).

8. DISCUSIÓN

Hematocrito y hemoglobina (Hb)

El hematocrito y la Hb son parámetros incluidos dentro de la citología hemática y son utilizados para establecer el diagnóstico de anemia (Ruiz Argüelles y Ruiz Reyes, 1995). Los valores promedio de hematocrito del tursión reportados en el presente estudio ($42.4 \pm 3.51\%$), son similares a los reportados por Fair *et al.* (2006) para tursiones de vida libre (silvestres, $40 \pm 2.9\%$). Además, el intervalo de los valores de hematocrito (38.5 a 48.5%) coincide con el reportado para tursiones en cautiverio (38 a 44%) y de vida libre (37 a 47%) (Bossart *et al.*, 2001). En el presente trabajo, el porcentaje de hematocrito para los humanos fue de $39.5 \pm 0.5\%$. El intervalo de valores control reportado para humanos oscila entre 36.1 y 50.3% (Enciclopedia Médica A.D.A.M, 2014).

La concentración de Hb ($13.07 \pm 1.13 \text{ g dL}^{-1}$) en las muestras de tursiones analizadas en el presente trabajo es similar a la reportada para tursiones silvestres de Carolina del Sur y Florida, 14 ± 0.9 y $14.4 \pm 1.11 \text{ g dL}^{-1}$, respectivamente (Fair *et al.*, 2006). El intervalo de valores de Hb (13.4 a 18.8 g

dL⁻¹) coincide con el reportado para tursiones en cautiverio (13.5 a 15.5 g dL⁻¹) (Bossart *et al.*, 2001). La concentración de Hb en humanos fue de 12.32 ± 0.43 g dL⁻¹. Los valores control de este parámetro que se reportan para humanos son de 12.1 a 17.2 g dL⁻¹ (Enciclopedia médica A.D.A.M, 2014). Los resultados de ambos parámetros hematológicos (hematocrito y Hb) indican que los análisis de las muestras de tursiones y humanos no se encuentran comprometidos por cuadros clínicos de anemia o desnutrición.

Actividad enzimática de purina nucleósido fosforilasa (PNP)

En este estudio, la actividad de PNP fue mayor en eritrocitos de humanos en comparación con los de tursiones. Craik *et al.* (1997) reportaron que la actividad de PNP en los eritrocitos de tursiones es menor que en humanos y conejos. Aunque en ambos trabajos se estudiaron tursiones en cautiverio, en el presente trabajo la actividad de PNP corresponde al 63% de la actividad reportada para humanos, a diferencia del estudio de Craik *et al.* (1997) en el que se reporta un 7.4% (datos normalizados a la actividad de PNP en humanos). La diferencia encontrada entre estos estudios puede atribuirse, principalmente, al tamaño de muestra (4 veces mayor en el presente estudio) y a la edad de los individuos (juveniles en el presente estudio). Los resultados de Craik *et al.* (1997) fueron descritos para tursiones adultos. Además, el metabolismo de purinas en mamíferos parece estar influenciado por la edad y senescencia. La concentración de HX, xantina y ácido úrico incrementa con la

edad en modelos murinos (Willems *et al.*, 2003). Aparentemente, la capacidad para reciclar purinas utilizando las enzimas PNP y HGPRT es menor en ratones longevos en comparación con los más jóvenes (Willems *et al.*, 2003). En los humanos, la producción de nucleótidos depende en su mayoría de la vía del reciclado, por lo que la actividad de PNP es fundamental (Bzowska *et al.*, 2000). En este estudio la actividad de PNP y la concentración de HX en eritrocitos de tursiones fueron significativamente menores que en eritrocitos de humanos, lo anterior sugiere que en eritrocitos de tursiones la menor actividad de PNP contribuye a mantener bajos niveles de HX.

Actividad enzimática de xantina oxidasa (XO)

La enzima xantina oxidoreductasa (XOR) tiene 2 formas funcionales, la xantina deshidrogenasa que es NAD^+ - dependiente y produce NADH y urato, y la XO que es oxígeno-dependiente y produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 y urato (Mendoza-Coussette *et al.*, 2005). En humanos, la mayor actividad de XO se encuentra en hígado y yeyuno (Kooiji *et al.*, 1992). En humanos y ratas, la actividad de XO se ha reportado en tejidos como los pulmones, riñones, corazón, cerebro y plasma después de un evento de isquemia/reperfusión (Friedl *et al.*, 1990; Pacher *et al.*, 2006).

La actividad de XO se ha reportado en el plasma de humanos en condiciones control, es decir, individuos sanos y sin asociación con procesos

isquémicos (Newaz *et al.*, 1998). La determinación de la actividad de XO en plasma en dicho estudio requirió un volumen de muestra de 200 μL , y el análisis se realizó durante las primeras dos horas a partir de la colecta de la muestra; los autores sugieren que el tiempo de análisis de la muestra es importante para determinar la actividad de XO (Newaz *et al.*, 1998). La actividad de XOR en la circulación se ha determinado utilizando métodos radioactivos, de fluorescencia, quimioluminiscentes y espectrofotométricos; por lo anterior, los valores reportados de su actividad en humanos sanos fluctúa entre 0 y 4200 mU L^{-1} (Harrison, 2002; Mendoza-Coussette *et al.*, 2005). En el presente estudio, no se encontraron diferencias en la actividad de XO en plasma de humanos y tursiones. Los niveles reportados para humanos y tursiones (0.59 ± 0.54 , 0.36 ± 0.11 $\text{mU } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente) coinciden con el intervalo antes mencionado. La actividad de XO en plasma de elefantes marinos del norte se ha relacionado con el ayuno y las apneas del sueño y del buceo, sugiriendo que los tejidos sometidos a condiciones de isquemia en estas especies tienen la capacidad de metabolizar HX y xantina (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). Los resultados de este estudio sugieren que en el plasma de tursiones no hay una contribución significativa para metabolizar la HX a xantina y ácido úrico.

En eritrocitos de humanos, el producto final del catabolismo del ATP es la HX y se considera que en estas células la actividad de XO es muy baja o nula (Dudzinka, 2006). Sin embargo, Kaynar *et al.* (2005) reportan actividad de

XO en eritrocitos de humano en condiciones basales ($0.61 \pm 0.15 \text{ U g}^{-1} \text{ Hb}$) y en eritrocitos de pacientes con cáncer de pulmón ($0.92 \pm 0.13 \text{ U g}^{-1} \text{ Hb}$); los autores no describen en sus métodos la técnica que utilizaron para cuantificar la actividad de XO. Debido a la interferencia que causa el Fe^{+2} de la Hb con la señal de fluorescencia del kit utilizado en el presente estudio para evaluar la actividad de XO, no fue posible cuantificar la actividad de esta enzima en las muestras de eritrocitos.

Actividad enzimática de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT)

Los valores reportados de la actividad de HGPRT en eritrocitos de humano se encuentran en un intervalo de 50 a 500 $\text{nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de Hb (Sebesta *et al.*, 2008; Balakireva y Godard, 2011) y de 160.87 a 293.90 $\text{nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (Jharap *et al.*, 2011). En el presente estudio, los resultados de la actividad de HGPRT en eritrocitos de humanos y tursiones coinciden con lo reportado en la literatura. Aunque no existen reportes previos de actividad de HGPRT en plasma de humanos, en este estudio se detectó actividad de HGPRT por arriba del límite de detección en 5 de 12 muestras. En tres de ellos, la actividad posiblemente sea la contribución del contenido eritrocitario, ya que las muestras mostraban un ligero tono rojizo, lo cual sugiere hemólisis en la muestra. En tursiones, tampoco existen reportes previos de la actividad de HGRPT en eritrocitos ni en plasma; sin embargo, en plasma de elefantes

marinos del norte se reportó que la actividad de HGPRT es de 5.5 a 9 $\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{L}^{-1}$ de plasma en condiciones de ayuno (Soñanez-Organis *et al.*, 2012). En el plasma de tursiones se observaron concentraciones de HX 4 veces más elevadas en comparación con los humanos. La actividad de HGPRT parece sugerir que en tursiones esta enzima, además de prevenir la acumulación de HX en plasma, permite el reciclado eficiente de purinas para producir nucleótidos como el IMP, AMP y GMP. Un resultado similar se reportó en elefantes marinos del norte en condiciones de ayuno, sugiriendo que el reciclado de purinas por acción de la HGPRT en plasma podría contribuir a prevenir la acumulación de otros derivados de purinas (Soñanez-Organis *et al.*, 2012).

Se ha señalado recientemente que la concentración de HX correlaciona mejor que la del lactato como indicador de ejercicio físico (Zielinski *et al.*, 2013). En los tursiones, la actividad de HGPRT y las concentraciones de HX en plasma podrían estar relacionados con el tipo de buceos que realizan. De manera general, los mamíferos marinos utilizan modalidades de nado que requieren menos energía (Kooyman, 1989; Williams *et al.*, 1999), aunque los tursiones realizan buceos de corta duración y nado activo (Williams *et al.*, 1999). Es posible que en tursiones la actividad circulante de HGPRT contribuya a prevenir la acumulación de HX y su transformación a xantina y ácido úrico, productos de desecho no reciclables del metabolismo de purinas. Aunque aparentemente esta enzima no participa directamente en la regeneración de

ATP en el plasma, HGPRT recicla purinas que pueden ser incorporadas hacia otros tejidos; la actividad de esta enzima sugiere una mayor capacidad para reciclar purinas durante los ciclos de buceo y los procesos de hipoxia e isquemia en tursiones.

En el presente estudio, se encontró que las concentraciones de ATP y ADP en eritrocitos y plasma de humanos son mayores a las de tursiones. Los menores niveles de estos metabolitos, además de los mayores niveles de AMP, en eritrocitos y plasma de tursiones parecen estar relacionados al momento en que se colectó la muestra. Durante el procedimiento de toma de muestra los tursiones estuvieron sometidos a apnea.

En el músculo de humanos, las concentraciones de metabolitos involucrados en el metabolismo energético o producción de energía (inosina, ADP y ATP) fueron mayores que en eritrocitos y plasma de la misma especie. Por lo tanto, se sugiere que la actividad de HGPRT sería mayor que en eritrocitos y plasma. Es posible que en músculo de tursiones ocurra una situación similar dada su constante actividad física; ello sugeriría un proceso más eficiente para producir ATP a través de la vía IMP-HGPRT. Sin embargo, es necesario cuantificar los niveles de nucleótidos e HGPRT en músculo de tursiones para validar esta hipótesis.

Actividad enzimática de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)

En mamíferos terrestres la síntesis *de novo* de purinas se lleva a cabo principalmente en el hígado (Furukawa *et al.*, 2015). En los eritrocitos de humanos este mecanismo no se lleva a cabo debido a la ausencia de la enzima glutamina PRPP amidotransferasa (Dudzinska *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de actividad de IMPDH en eritrocitos de humanos, aunque ésta es relativamente baja ($4\text{-}183 \text{ pmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína) (Montero *et al.* 1995). En este estudio, la identificación de los picos correspondientes a XMP fue minuciosa debido al amplio rango en el que, como resultado del tratamiento con ácidos, cambiaron su espectro de absorción. Aunque en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas, en humanos los niveles de actividad de IMPDH fueron relativamente mayores y los niveles de GDP fueron menores que en los tursiones (Tabla II). Lo anterior sugiere que en eritrocitos de tursión la síntesis de purinas *de novo* no contribuye a la producción de nucleótidos de guanina como una adaptación a los ciclos de buceo; en cambio, el mayor aporte de purinas es por la vía del reciclado.

Concentración de metabolitos de purinas

La acumulación de HX en tejidos de mamíferos marinos es indicador de la degradación de ATP, además, se le considera un potencial generador de radicales libres de oxígeno (Elsner *et al.*, 1995; Elsner *et al.*, 1998). En

eritrocitos de tursiones, las concentraciones de HX, ADP, GTP y ATP fueron menores que aquellas en humanos y la concentración de AMP fue mayor en tursiones que en humanos (presente estudio). En eritrocitos maduros (que han perdido el núcleo) de humanos, no es posible producir ATP mediante la vía de reciclado de purinas debido a la falta de la enzima adenilosuccinato sintetasa, necesaria para convertir el IMP a AMP (Simmonds *et al.*, 1989; Schuster y Kenanov, 2005). La menor concentración de ATP en eritrocitos de tursiones sugiere que, al igual que en los humanos, la vía de reciclado no contribuye a la producción de ATP bajo las condiciones de este estudio. Se ha reportado que las concentraciones de ADP y ATP en eritrocitos de humanos y tursiones son similares (Harkness y Grayson, 1969). Sin embargo, en el presente estudio las concentraciones de ADP y ATP fueron menores en los eritrocitos y plasma de tursiones que de humanos. Los eritrocitos de humano responden a las demandas energéticas con un incremento en la concentración de AMP, y la disminución de ATP y de las reservas de nucleótidos de adenina (Ataullakhanov y Vitvisky, 2002). Es posible que los resultados de este estudio indiquen una respuesta o adaptación del metabolismo de purinas a las demandas energéticas de la apnea en eritrocitos de tursiones. La mayor concentración de AMP y menor concentración de ATP podrían señalar las demandas de energía y activar la catálisis enzimática para producir ATP, en el caso del eritrocito, mediante la vía de la glucólisis que en estas células es la vía metabólica principal para la producción de ATP (Ataullakhanov y Vitvisky, 2002). Por lo anterior, es posible que las diferencias en las concentraciones de

nucleótidos de purinas está relacionada a la toma de muestra. En el trabajo de Harkness y Grayson (1969) las muestras fueron tomadas de organismos bajo anestesia general, en el presente estudio no se utilizó anestesia y los delfines se mantuvieron en posición ventral (bajo condiciones de apnea), las mediciones de nucleótidos de adenina encontradas en este estudio podrían reflejar la pronta respuesta del metabolismo de purinas a un evento asociado al buceo. Los eritrocitos pueden liberar ATP en respuesta a las disminuciones en la tensión de oxígeno, como consecuencia se incrementa la concentración de AMP cíclico (Ellsworth *et al.*, 2015). Aunque en este estudio no se midió directamente la concentración de AMP cíclico, la mayor concentración de AMP sugiere que puede ser utilizado para producir su forma cíclica; como se sugirió anteriormente, la menor concentración de ATP podría relacionarse a la respuesta del metabolismo de purinas a las condiciones de apnea.

En los eritrocitos de humanos la mayoría de los nucleótidos de purinas (aproximadamente el 85%) son de adenina (Dudzinska *et al.*, 2006). En el presente estudio, los nucleótidos de adenina se encontraron en mayor proporción que los de guanina. La menor concentración de los nucleótidos de guanina en eritrocitos de tursiones y humanos coincide con la baja actividad de IMPDH reportada para humanos (Montero *et al.*, 1995). La mayor concentración de NAD⁺ en eritrocitos de tursiones coincide con la reportada por Harkness y Grayson (1969). Aparentemente, el metabolismo del eritrocito utiliza activamente la vía de las pentosas fosfato (Harkness y Grayson (1969).

Esta vía requiere NADP^+ como cofactor y su principal objetivo es la formación de ribosa-5-fosfato. Es posible que en los tursiones la producción de pentosas se relacione directamente con la producción de PRPP, el cual es un monosacárido utilizado como cofactor en la vía del reciclado de purinas. Es necesario medir las concentraciones de PRPP en sangre de tursiones para comprobar dicha hipótesis.

Las concentraciones de ADP, GTP, y ATP fueron significativamente menores y las concentraciones de HX y AMP fueron significativamente mayores en el plasma de tursiones que de humanos. Sin embargo, estos niveles no pueden considerarse como indicador de degradación de ATP en plasma de tursiones debido a que la mayor concentración de IMP, la menor concentración de ácido úrico, los niveles de xantina y la mayor actividad de HGPRT sugieren un mayor enfoque hacia el reciclado de purinas. Lo anterior parece indicar que en el plasma de tursiones el reciclado de purinas contribuye a mantener los niveles de los derivados de purinas y asegurar su disponibilidad para otros tejidos, incluyendo los eritrocitos, ya que éstos son altamente permeables a nucleósidos (Craik *et al.*, 1997). La hipótesis anterior es sustentada por la actividad de HGPRT cuantificada en el plasma de tursiones. El reciclado de purinas vía IMP-HGPRT utiliza HX como sustrato y la conversión a IMP es catalizada por HGPRT. En el plasma de tursiones los componentes de dicha reacción son mayores que los de humanos.

Los niveles de ácido úrico fueron significativamente mayores en plasma de humanos que de tursiones (presente estudio). En tursiones, la baja concentración de ácido úrico refuerza la hipótesis sobre el uso de HX como sustrato de la enzima HGPRT más que como un producto de la degradación del ATP. Además de la adenina y adenosina, la HX es considerada como el principal sustrato en las vías de reciclado (Schuster y Kenanov, 2005). La actividad de la enzima uricasa fue examinada para determinar su posible participación en el catabolismo de purinas en plasma de tursiones. La falta de actividad directamente en el plasma sugiere que el ácido úrico no es metabolizado para formar alantoína. Cabe mencionar que las concentraciones de los metabolitos de purinas en el plasma de ambas especies pueden estar influenciadas por la contribución de otros órganos o tejidos. En el caso de la enzima uricasa su mayor actividad se encuentra en el hígado (Varela-Echavarría *et al.*, 1988).

Al igual que en eritrocitos de tursiones y humanos, en músculo de humanos los niveles de xantina y ácido úrico estuvieron por debajo del límite de detección. Lo anterior sugiere que en las células musculares al igual que en los eritrocitos es fundamental evitar la acumulación de purinas no reciclables. Por lo tanto, es posible anticipar que en el músculo de tursiones los niveles de HX, xantina, ácido úrico sean similares a los encontrados en humanos, y las concentraciones de inosina, ADP y ATP sean incluso mayores que las de músculo de humanos. En el caso de la piel no fue posible hacer comparación

entre especies y/o tejidos debido a la resolución del análisis por HPLC. En el caso de la piel de humano la cantidad de muestra fue escasa y con un contenido considerable de tejido adiposo; las muestras de piel de tursión fueron obtenidas por frotis cutáneo por lo que la mayoría de las células colectadas pueden considerarse senescentes o queratinizadas. Sin embargo, tomando en cuenta los resultados de este estudio, es posible anticipar que en piel de humanos y tursiones los niveles de ADP y ATP sean menores que en eritrocitos, plasma y músculo. Debido a la alta tasa de división celular de la epidermis es posible inferir que las concentraciones de nucleósidos de adenina y guanina y las actividades de PNP e IMPDH sean mayores en piel de tursiones y humanos que en eritrocitos y músculo.

Aspectos filogenéticos del metabolismo de purinas en organismos acuáticos y terrestres

Los compuestos nitrogenados derivados del metabolismo de purinas, degradación de ácidos nucleicos, y digestión de proteínas producen productos de desecho tóxicos como amonio, ácido úrico y urea, entre otros (Skinner *et al.*, 2006). En el curso de la evolución, los vertebrados perdieron sucesivamente algunas enzimas del catabolismo de las purinas, dando origen a distintos productos nitrogenados (Balinsky, 1972). De manera general, el mecanismo de eliminación de estos compuestos de desecho depende de cada clase de animal, las condiciones ambientales a las que está adaptado, y a las ventajas

biológicas de eliminar los desechos tóxicos, como la conservación de agua, la solubilidad del producto de desecho, la osmoregulación, regulación del balance ácido-base y las propiedades antioxidantes del ácido úrico (Balinsky, 1972; Nelson y Cox, 2005; Skinner *et al.*, 2006). En los animales terrestres la conservación del agua es necesaria para su supervivencia; por lo tanto, una ventaja evolutiva es desechar los compuestos nitrogenados en forma de ácido úrico. Un gramo de ácido úrico requiere 8 mL de agua para ser removido, mientras que para eliminar un gramo de amonio se necesitan aproximadamente 400 mL de agua (Wright, 1995; Skinner *et al.*, 2006).

En el caso del tursión, el producto final del metabolismo de purinas es un compuesto más soluble y menos perjudicial que el ácido úrico (alantoína), mientras que en los humanos la acumulación de ácido úrico es un problema de salud con alta prevalencia. En el presente estudio, la concentración de ácido úrico en el plasma de tursiones fue menor que en humanos; sin embargo, en plasma de humanos se considera que el ácido úrico es responsable del 60 a 70% de su capacidad antioxidante (Proctor, 2008).

9. CONCLUSIÓN

Las concentraciones mayores de HX e IMP, y la mayor actividad de HGPRT en plasma de tursiones sugieren una mayor capacidad para reciclar purinas en comparación con el humano. Las ventajas de reciclar purinas en el plasma de tursiones puede ser relevante después de los eventos de buceo,

donde el ATP es consumido y debe ser restituido rápidamente para ser entregado y utilizado por los tejidos que lo hayan consumido. Lo anterior puede ser considerado como una adaptación bioquímica que les permite estar preparados ante los ciclos de hipoxia asociados al buceo. La escasa actividad de la enzima uricasa y la menor concentración de ácido úrico en el plasma de tursiones sugieren que la HX no es degradada a su producto final alantoína en este componente de la sangre; por lo tanto, no hay evidencia de la acumulación de purinas no reciclables (xantina y ácido úrico). Además, posiblemente se evite daño a los tejidos por sobreproducción de especies reactivas de oxígeno vía la participación de XO. Las menores concentraciones de ADP, ATP y GTP en el plasma de tursiones corresponden a sus menores concentraciones encontradas en eritrocitos. En los eritrocitos de tursiones la vía del reciclado de purinas aparentemente es menos activa que en los humanos debido a la menor actividad de PNP y HGPRT. La menor concentración de HX y la mayor concentración de AMP sugieren que el ATP no es degradado bajo condiciones fisiológicas. Mantener los nucleótidos de adenina como AMP podría contribuir a restaurar de manera más eficiente sus formas di- y tri-fosfatadas, debido a que los incrementos de AMP activan las vías para producir ATP. La actividad de IMPDH es similar en eritrocitos de ambas especies, lo que sugiere que la vía de la síntesis *de novo* no contribuye de manera sustancial en la producción de nucleótidos de guanina en los tursiones. En conjunto, los resultados del presente trabajo así como la literatura sugieren que en los mamíferos marinos, específicamente los tursiones, los principales componentes de la vía del

reciclado de purinas se modulan para compensar las demandas de metabolitos de purinas y prevenir los efectos nocivos de su degradación/acumulación en los tejidos.

10. RECOMENDACIONES

Los análisis posteriores sobre el metabolismo de purinas en sangre de tursiones deberían considerar la colecta de las muestras sin la condición de apnea. Además, debido a que la alimentación de los delfines en cautiverio es rica en purinas se sugiere incluir el análisis de muestras provenientes de poblaciones silvestres. La evaluación del metabolismo de purinas en tursiones silvestres, bajo influencia de una dieta más diversa y una mayor actividad física, permitirá obtener información adicional sobre las adaptaciones del metabolismo de purinas en tursiones.

Los resultados del metabolismo de purinas analizados en este estudio, tanto en plasma como en eritrocitos, son un indicio para considerar el estudio de la respuesta de receptores del sistema nervioso central al ATP extracelular (vía purinérgica) en tejidos como el cerebro o cultivos celulares.

Dado que se logró estandarizar las condiciones para establecer cultivos celulares de mioblastos de humano, se sugiere la colecta de muestras de músculo esquelético de mamíferos marinos para establecer los cultivos de

mioblastos de dichas especies. El análisis del metabolismo de purinas en los cultivos celulares queda como posible continuación del proyecto.

11. REFERENCIAS

Ally, A., G. Park. 1992. Rapid determination of creatine, phosphocreatine, purine bases and nucleotides (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP) in heart biopsies by gradient ion-pair reversed-phase liquid chromatography. *J Chrom.* 575(1): 19–27.

Andersen, H.T. 1966. Physiological adaptations in diving vertebrates. *Physiol Rev.* 46(2): 212-243.

Ataullakhanov, F.I., V.M. Vitvitsky. 2002. What determines the intracellular ATP concentration. *Biosci Rep.* 22(5-6): 501-511.

Balakireva, L., N. Godard. 2011. A continuous spectrophotometric assay for rapid measurement of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) activity in cell lysates. *Nature Application Notes.*

Balinsky, J.B. 1972. Phylogenetic aspects of purine metabolism. *S Afr Med J.* 46(29): 993–997.

Baranowska-Bosiacka, I., A.J. Hlynczak, B. Wiszniewska, M. Marchlewicz. 2004. Disorders of purine metabolism in human erythrocytes in the state of lead contamination. *Pol J Environ Stud.* 13(5): 467-476.

Borges, F., E. Fernandes, F. Roleira. 2002. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem.* 9(2): 195–217.

Bossart, G. D., T.H. Reidarson, L.A. Dierauf, D.A. Duffield. 2001. Clinical pathology. En L. A. Dierauf y F. M. D. Gulland (Eds). *The CRC handbook of marine mammal medicine* (2nd ed). CRC Press. Boca Raton. FL. USA. 383-430 pp.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 248-254.

Butler, P.J., D.R. Jones. 1997. Physiology of diving of birds and mammals. *Physiol Rev.* 77(3): 837-899.

Bzowska, A., E. Kulikowska, D. Shugar. 2000. Purine nucleoside Phosphorylases: propiedades, funciones and clinical aspects. *Pharmacol Therapeut.* 88:349-425.

Carlucci, F., B. Biagioli, M. Maccherini, G. Sani, F. Simeone, F. Bizzarri, D. Perret, E. Marinello, R. Pagani, A. Tabucchi. 1998. Myocardial ischemic injury and purine metabolism in patients undergoing coronary artery bypass. *Clin Biochem.* 31(4): 235–239.

Chu, S.Y., P. Cashion, M. Jiang. 1989. A new colorimetric assay for purine nucleoside phosphorylase. *Clin Biochem.* 22(5): 357–362.

Craik, J.D., J.D. Young, C.I. Cheeseman. 1997. Nucleoside transport in erythrocytes from bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Comp Biochem Physiol A.* 117(1): 127–134.

Crocker, D.E., D.P Costa. 2002. Pinniped physiology. In: Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M (eds) *Encyclopedia of marine mammals*. Academic. San Diego.

Curto, R., E.O. Voit, M. Cascante. 1998. Analysis of abnormalities in purine metabolism leading to gout and to neurological dysfunctions in man. *Biochem J.* 329(3): 477–487.

Davis, R.W., L. Polasek, R. Watson, A. Fuson, T.M. Williams, S.B. Kanatous. 2004. The diving paradox: new insights into the role of the dive response in air-breathing vertebrates. *Comp Biochem Physiol A.* 138: 263-268.

Dudzinska, W., A.J. Hlynczak, E. Skotnicka, M. Suska. 2006. The purine metabolism of human erythrocytes. *Biochem (en Ruso).* 71(5): 467–475.

Ellsworth, M.L., C.G. Ellis, R.S. Sprague. 2015. Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle. *Acta Physiologica.* 216: 265-276.

Ely, S.W., R.M. Berne. 1992. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation*. 85(3): 893–904.

Elsner, R., S. Øyasæter, O.D. Saugstad, A.S. Blix. 1995. Seal adaptations for long dives: recent studies of ischemia and oxygen radicals. En: A.S, Blix, L. Walloe, O. Ultang (ed.). *Whales, seals, fish and man. International Symposium on the Biology of Marine Mammals in the North East Atlantic*. Tromso, Norway, 1994. Elsevier Science B.V, Amsterdam, 371–376.

Elsner, R. 1999. Living in water: solutions to physiological problems. En: E.I, Reynolds, S. A. Rommel (ed.). *Biology of marine mammals*. Smithsonian Institution Press .Washington DC. 73-116.

Elsner, R., S. Oyasaeter, R. Almaas, O.D. Saugstad. 1998. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. *Comp Biochem Physiol A*, 119(4): 975–980.

Enciclopedia Médica A.D.A.M. [Internet]. Atlanta (GA): A.D.A.M., Inc.; ©2005. Hemoglobina; [actualizado 25 feb 2014; consulta 10 ago 2015]; [aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003645.htm>

Fair, P. A., T.C. Hulsey, R.A. Varela, J.D. Goldstein, J. Adams, E.S. Zolman, G.D. Bossart. 2006. Hematology, sereum chemistry, and cytology findings from apparently healthy bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting the estuarine waters of Charleston, South Carolina. *Aquat Mammals*. 32(2): 182-195.

Fox, I.H. 1981. Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation. *Metabolism*. 30(6): 616–634.

Friedl, H.P., D.J. Smith, G.O. Till, P.D. Thomson, D.S. Louis, P.A. Ward. 1990. Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol* 136: 491-495.

Furukawa, J., K. Inoue, J. Maeda, T. Yasujima, K. Ohta, Y. Kanai, T. Takada, H. Matsuo, H. Yuasa. 2015. Functional identification of SLC43A3 as an equilibrative nucleobase transporter involved in purine salvage in mammals. *Sci Rep*. 5: 15057.

Giannattasio, S., S. Gagliardi, M. Samaja, E. Marra. 2003. Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and β -nicotinamida adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. *Brain Res Protoc.* 10: 168-174.

Glander, P., K.P. Braun, P. Hambach, S. Bauer, I. Mai, I. Roots, J. Waiser, L. Fritsche, H.H. Neumayer, K. Budde. 2001. Non-radioactive determination of inosine 5'-monophosphate dehydro-genase (IMPDH) in peripheral mononuclear cells. *Clin Biochem.* 34(7): 543–549.

Halliwell, B., J. Gutteridge. 2007. *Free radicals in biology and medicine.* Cuarta edición. Oxford University Press. Oxford, UK.

Harkness, D.R., V. Grayson. 1969. Erythrocyte metabolism in the bottle-nosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *Comp Biochem Physiol.* 28: 1289-1301.

Harrison, R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 33(6): 774-797.

Henderson, J.F., F.M. Rosenbloom, W.N. Kelley, J.E. Seegmiller. 1968. Variations in purine metabolism of cultured skin fibroblasts from patients with gout. *J Clin Invest.* 47(7): 1511–1516.

Hendstrom, L. 2009. IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism and inhibition. *Chem Rev.* 109(7): 2903-2928.

Ignoul, S., J. Eggermont. 2005. CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *Am J Physiol-Cell Ph.* 289(6)C:1369–1378.

Jancso, M.A., S.A Sculaccio, O.H Thiemann. 2001. Identification of sugarcane genes involved in the purine synthesis pathway. *Genet Mol Biol.* 24(1-4): 251-255.

Jharap, B., N.K.H. de Boer, R.M. Vos, K. Smid, A. Zwiers, G.J. Peters, C.J.J. Mulder, A.J. Wilhelm, A.A. van Bodergraven. 2011. Biotransformation of 6-thioguanine in inflammatory bowel disease patients: a comparison of oral and intravenous administration of 6-thioguanine. 163: 722-731.

Jurecka, A. 2009. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 32:247-263.

- Kanatous, S.B., R.W. Davis, R. Watson, L. Polasek, T.M. Williams, O. Mathieu-Costello. 2002. Aerobic capacities in the skeletal muscles of Weddell seals: key to longer dive durations? *J Exp Biol.* 205: 3601-3608.
- Kaynar, H., M. Meral, H. Turhan, M. Keles, G. Celik, F. Ackay. 2005. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Letters.* 227: 133-139.
- Klatsky, L.J., R.S. Wells, J.C. Sweeney. 2007. Offshore bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): movement and dive behavior near the Bermuda Pedestal. *J Mammal.* 88(1): 59-66.
- Kooij, A., M. Schijns, W.M. Frederiks, C.J. Van Noorden, J. James. 1992. Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues--a histochemical and biochemical study. *Virchows Archiv.* 63, 17-23.
- Kooyman, G.L. 1989. *Diverse divers.* Springer-Verlag Berlin.
- Kooyman, G.L. 2002. Diving physiology. In: Perrin, W.F., Würsig, B., Thewissen, J.G.M (eds) *Encyclopedia of marine mammals.* Academic. San Diego.
- Kooyman, G.L., H.T Andersen. 1969. Deep Diving. In: Andersen (Ed). *The biology of marine mammals.* Academic Press. New York. 65-94 pp
- Kooyman, G.L., P.J. Ponganis. 1998. The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annu Rev Physiol.* 60:19-32.
- LeBoeuf, B. J., D.P. Costa, A.C. Huntley, G.L. Kooyman, R.W. Davis. 1986. Pattern and depth of dives in Northern elephant seals, *Mirounga angustirostris.* *J Zool Lond A.* 208: 1-7.
- Lesch, M., W.L. Nyhan. 1964. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med.* 36: 561-570.
- Levartovsky, D., A. Lagziel, O. Sperling, U. Liberman, M. Yaron, T. Hosoya, K. Ichida, H. Peretz. 2000. XDH gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: a second report. *Kidney Int.* 57(6): 2215-2220.

Lindholm, P., C.E.G Lundgren. 2009. The physiology and pathophysiology of human breath-hold diving. *J Appl Physiol.* 106: 284-292.

Lockyer, C., R. Morris. 1987. Observations o diving behaviour and swimming speeds in a wild juvenile *Tursiops truncatus*. *Aquat Mammals.* 13: 31-35.

Makarewicz, W. 1998. Response of purine metabolism to hypoxia and ischemia. En: Griesmacher, A., Chiba, P., Müller, M.M. Purine and Pyrimidine metabolism in man IX. Plenum Press. New York. 351-357.

Marro, P.J., S. Baumgart, M. Delivoria-Papadoupoulos, S. Zirin, L. Corcoran, S.P. McGaurn, L.E. Davis, R.R. Clancy. 1997. Purine metabolism and inhibition of xanthine oxidase in severely hypoxic neonates going onto extracorporeal membrane oxygenation 1. *Pediatr Res.* 41(4;1): 513–520.

Mastropasqua, L., M. Ciancaglini, G. Di Tano, P. Carpineto, L. Lobefalo, B. Loffredo, D. Bosco, M. Columbaro, E. Falcieri. 1998. Ultraestructural changes in rat cornea after prolonged hyperbaric hypoxia. *J Submicrosc Cytol Pahol.* 30(2): 285-293.

Mendoza-Coussette, U., G. Piñeiro, J. Carlos, P.L. Gastell, A.A. Armenteros. 2005. Xantina oxidoreductasa, propiedades, funciones y regulación de su expresión genética. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 24(2): 0-0.

Montero, C., J.A. Duley, L.D. Fairbanks, M.B. McBride, V. Micheli, A.J. Cant, G. Morgan. 1995. Demonstration of induction of erythrocyte inosine monophosphate dehydrogenase activity in Ribavirin-treated patients using a high performance liquid chromatography linked method. *Clin Chim Acta.* 238: 169-178.

Moriwaki, Y., T. Yamamoto, K. Higashino. 1999. Enzymes involved in purine metabolism - a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol.* 14(4): 1321–1340.

Murray, R., D. Granner, P. Mayes, V. Rodwell. 2006. Harper's illustrated biochemistry. McGraw-Hill. 27va ed. New York. 672 pp.

Murry, C.E., R.B. Jennings, K.A. Reimer. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74: 1124-1136.

Murry, C.E., V.J. Richard, K.A. Reimer, R.B. Jennings, R.B. 1990. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res.* 66: 913-931.

Nelson, D., M.M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry.* W.H. Freeman. 4ta ed., New York. 1119 pp.

Newaz, M.A., N.N.N. Adeb. 1998. Detection of xanthine oxidase in human plasma. *Med J Malaysia.* 53(1): 70-75.

Noren, S.R., T.M. Williams, D.A. Pabst, W.A. McLellan, J.L. Dearolf. 2001. The development of diving marine endotherms: preparing the skeletal muscles of dolphins, penguins, and seals for activity during submergence. *J Comp Physiol B.* 171:127-134.

Pacher, P., A. Nivorozhkin, C. Szabó. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 58(1): 87-114.

Padilla, A.M., J.D. Padilla. 2004. Estado actual de la preservación pulmonar. *Arch Bronconeumol.* 40(2): 86-93.

Peirce, S.M., T.C. Skalak, G.T. Rodeheaver. 2000. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen.* 8(1): 68-76.

Proctor, P.H. 2008. Uric acid and neuroprotection. *Stroke* 39, e126.

Ramirez, J.M., L.P. Folkow, A.S. Blix. 2007. Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annu Rev Physiol.* 69:113-143.

Rao, P.N., T.R. Walsh, L. Makowka, R.S. Rubin, T. Weber, J.T. Snyder, T.E. Starzl. 1990. Purine nucleoside phosphorylase: a new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. *Hepatology.* 11(2): 193-198.

Rathore, R., Y.M. Zheng, C.F. Niu, Q.H. Liu, A. Korde, Y.S. Ho, Y.X. Wang. 2008. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKC ϵ signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 45: 1223-1231.

Rosenbloom, F.M., J.F. Henderson, I.C. Caldwell, W.N. Kelley, J.E. Seegmiller. 1968. Biochemical bases of accelerated purine biosynthesis de novo in human fibroblasts lacking hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem.* 243(6): 1166–1173.

Ruiz-Argüelles, G.J., G. Ruiz-Reyes. 1995. Interpretación de la citometría hemática. Índices y parámetros eritrocíticos. Diagnostico de anemia, en: Ruiz-Argüelles, G.J. (ed) *Fundamentos de Hematología*. Editorial Panamericana. México. 25-35.

Schuster, S. Kenanov. 2005. Adenine and adenosine salvage pathways in erythrocytes and the role of S- adenosylhomocysteine hydrolase. A theoretical study using elementary flux modes. *FEBS J.* 272: 5278-5290.

Sebesta, I., Stiburkova, B., Dvorakova, L., Hrebicek, M., Minks, J., Stolnaja, L., Vernerova, Z., Rychlík, I. 2008. Unusual presentation of Kelley-Seegmiller syndrome. *Nucleos Nucleot Nucl.* 27: 648-655.

Silva-García, M.C., M. García-Bermejo. 2004. *Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínicos 1a. ed.* Sevilla, Mad. 482pp.

Silveira, M., W.B. Yoshida. 2004. Isquemia e reperfusao em músculo esquelético: mecanisos de lesao e perspectivas de tratamento. *J Vasc Br.* 3 (4): 367-378.

Simmonds, H.A., L.D. Fairbanks, J.A. Duley, G.S. Morris. 1989. ATP formation from deoxyadenosine in human erythrocytes: evidence for a hitherto unidentified route involving adenine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Bioscience Rep.* 9 (1): 75-85.

Skinner, K.A., D.A. Parks, N.H. Khoo. 2006. Uric acid metabolism. eLS.

Smith, C.R., J.R. Poindexter, J.M. Meegan, I.A. Bobulescu, E.D. Jensen, S. Venn-Watson, K. Sakhaee. 2014. Pathophysiological and physicochemical basis of ammonium urate stone formation in dolphins. *J. Urology.* 192(1): 260-266.

Soñanez-Organis, J.G., J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín, A. Aguilar, D.E. Crocker, R.M. Ortiz. 2012. Prolonged fasting increases purine recycling in post-weaned northern elephant seals. *J Exp Biol.* 215: 1448-1455.

Stocchi, V., L. Cucchiarini, F. Canestrari, M.P. Piacentini, G. Fornaini. 1987. A very fast ion-pair reversed-phase HPLC method for the separation of the most significant nucleotides and their degradation products in human red blood cells. *Anal Biochem* 167(1):181–190.

Stout, J.T., C.T. Caskey. 1985. HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Ann Rev Genet.* 19: 127-148.

Stuyver, L.J., S. Lostia, S.E. Patterson, J.L. Clark, K.A. Watanabe, M.J. Otto, K.W. Pankiewicz. 2002. Inhibitors of the IMPDH enzyme as potential anti-bovine viral diarrhoea virus agents. *Antivir Chem Chemoth.* 13(6): 345–352.

Terasawa, F., M. Kitamura, A. Fujimoto, S. Hayama. 2002. Seasonal changes of blood composition in captive bottlenose dolphins. *J Vet Med Sci.* 64(11): 1075-1078

Toro, A., M. Paiva, C. Ackerley, E. Grunebaum. 2006. Intracellular delivery of purine nucleoside phosphorylase (PNP) fused to protein transduction domains corrects PNP deficiency in vitro. *Cell Immunol.* 240 (2):107-115.

Torres, R.J., J.G. Puig. 2007. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2: 48-57.

Varela-Echavarría, A., R. Montes de Oca-Luna, H.A. Barrera-Saldaña. 1988. Uricase protein sequences: conserved during vertebrate evolution but absent in humans. *FASEB J.* 2(15): 3092-3096.

Vázquez-Medina, J.P., T. Zenteno-Savín, M.S. Tift, H.J. Forman, D.E. Crocker, R.M. Ortiz. 2011. Apnea stimulates the adaptive response to oxidative stress in elephant seals pups. *J Exp Biol.* 214: 4193-4200.

Venn- Watson, S., C.R. Smith, S. Stevenson, C. Parry, R. Daniels. E. Jensen, V. Cendejas, B. Balmer, M. Janech, B.A. Neely, R. Wells. 2013. Blood-based indicators of insulin resistance and metabolic syndrome in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Front Endocrinol.* 136(14): 1-8.

Wells, R.S., M.D. Scott. 1999. Bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). En: S.H. Ridgway, S.R. Harrison (ed.) *Handbook of marine mammals. Volume 6: the second book of dolphins and the porpoises.* Academic Press, UK. 137-182.

- Willems, L., B. Garnham, J.P. Headrick. 2003. Aging-related changes in myocardial purine metabolism and ischemic tolerance. *Exp Geront.* 38(10): 1169-1177.
- Williams, T.M., J.E. Haun, W.A. Friedl. 1999. The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) I. Balancing the demands of exercise for energy conservation at depth. *J Exp Biol.* 201: 2739-2748.
- Wright, P.A. 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *J Exp Biol.* 198: 273-281.
- Zanchi, F.B., R.A. Caceres, R.G. Stabeli, W.F. de Azevedo Jr. 2010. Molecular dynamics studies of a hexameric purine nucleoside phosphorylase. *J Mol Model.* 16: 543-550.
- Zieliński, J., B. Krasińska, K. Kusy. 2013. Hypoxanthine as a predictor of performance in highly trained athletes. *Int J Sports Med.* 34: 1079-1086.
- Zar, J.H. 2009. *Biostatistical analysis.* 5th ed. Prentice-Hall. Upper Saddle River N.J. 944.
- Zenteno-Savín, T., J.P. Vázquez-Medina, N.C. Cantú-Medellín, P.J. Ponganis, R. Elsner. 2012. Ischemia/reperfusion in diving birds and mammals: how they avoid oxidative damage. En: D. Abele, J. P. Vázquez-Medina y T. Zenteno-Savín (ed.). *Oxidative stress in aquatic ecosystems.* Wiley-Blackwell, Oxford. 178-189.
- Zhao, B., F.A. Summers, R.P. Mason. 2012. Photooxidation of Amplex red to resorufin: implications of exposing the Amplex red to light. *Free Radic Biol Med.* 50: 1080-1087.

12 ANEXOS

12.1 Anexo I. Registro de muestras colectadas de tursión (*Tursiops truncatus*).

Fecha	Hora	ID	Tejido	Sexo	Edad	Peso (kg)	Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Hematocrito (%)
29/05/12	9:18	DCD1	Sangre	H	8	192.5	18.8	48.5
29/05/12	9:18	DCD2	Sangre	M	9	195	16.8	45.5
29/05/12	9:18	DCD3	Sangre	M	6	188	14.9	43
06/06/12	9:50	DCD4	Sangre	M	—	237.5	13.4	39
06/06/12	10:00	DCD5	Sangre	H	~9	199	17.6	45.5
06/06/12	10:20	DCD6	Sangre	H	~8	197.5	13.5	38.5
15/07/12	N/D	DCD7	Sangre	M	8	158.5	N/D	47
16/07/12	11:20	DCD8	Sangre	H	~20	237	N/D	38
16/07/12	11:20	DCD9	Sangre/Piel	H	~10	202	N/D	40
06/08/12	N/D	DCD10	Sangre/Piel	M	6	180	14.3	40
07/08/12	N/D	DCD11	Sangre/Piel	H	9	129	15.3	42
07/08/12	N/D	DCD12	Sangre/Piel	H	6	171	15.3	42

12.2 Anexo II. Registro de muestras colectadas de humanos.

Fecha	Hora	ID	Tejido	Sexo	Edad	Peso (kg)	Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Hematocrito (%)
08/11/12	10:00	HSM1	Sangre	M	30	N/D	N/D	43
08/11/12	10:00	HSM2	Sangre	H	39	N/D	N/D	39.5
08/11/12	10:00	HSM3	Sangre	H	40	N/D	N/D	42
08/11/12	10:00	HSM4	Sangre	M	41	N/D	N/D	49
14/11/12	10:45	HSM5	Sangre	M	31	N/D	N/D	50
14/11/12	10:49	HSM6	Sangre	H	29	N/D	N/D	42.5
14/11/12	10:55	HSM7	Sangre	H	40	N/D	N/D	40
14/11/12	11:04	HSM9	Sangre	H	27	N/D	N/D	42
14/11/12	11:08	HSM10	Sangre/piel	H	32	N/D	N/D	47
14/11/12	11:15	HSM11	Sangre/piel	M	36	N/D	N/D	48
14/11/12	11:22	HSM12	Sangre/piel	H	30	N/D	N/D	44

12.3 Anexo III. Consentimiento informado para toma de muestras en pacientes humanos.



Carta de Consentimiento Informado

1. Nombre del estudio y Patrocinador

“Evaluación de los indicadores del metabolismo de purinas en sangre y cultivos primarios de fibroblastos de pacientes sometidos a cirugía exploratoria: respuesta a condiciones de hipoxia”

El estudio se llevará a cabo en el Hospital Central de Especialidades Médicas de La Paz Baja California Sur por Investigadores del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

2. Propósito del estudio

Lo(a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo con el propósito determinar la concentración, actividad, expresión génica de los principales indicadores del metabolismo de purinas en muestras de sangre, y cultivos primarios de piel provenientes de pacientes sometidos a cirugía exploratoria, bajo condiciones basales, así como la respuesta a condiciones de hipoxia en cultivos primarios de piel, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto. Al igual que usted, 12 personas más serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

3. Procedimientos

a) Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

- Previo a su cirugía se le solicitarán dos muestras de sangre de 5 ml cada una las cuales se tomarán por punción venosa, serán contenidas en tubos Vacutainer® sin anticoagulante para la recuperación de suero, y con EDTA como anticoagulante para recuperar plasma y eritrocitos
- Durante su cirugía se tomará una porción de piel de aproximadamente 30 mg con un tamaño aproximado a una semilla de lenteja. La muestra se tomará de la región abdominal, esto no le ocasionará ninguna molestia durante o posterior a su cirugía.

4. Posibles riesgos y molestias.

La toma de la muestra sanguínea podría ocasionarle dolor, el mismo que usted percibe en cualquier toma por punción sanguínea. La toma de muestra de músculo, no le ocasionará molestia alguna porque se utilizarán los pequeños trozos de tejido muscular que son cortados durante el mismo procedimiento.

5. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted.

No recibirá ningún beneficio al participar en este estudio.

Un posible beneficio de su participación en este estudio es que los resultados de las pruebas de laboratorio que le realizaremos le proporcionarán información sobre su estado de salud. El saber que su estado de salud es bueno pudiera ser un beneficio para usted.

Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la cadena causal de los riesgos para el desarrollo de Gota y otras enfermedades relacionadas al metabolismo del ácido úrico. Además los resultados de este estudio brindarán información relevante para el mejor manejo de personas como usted para brindará información de gran utilidad para futuros programas de prevención primaria y secundaria.

6. Participación o retiro.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera el que nosotros le brindemos los resultados hasta el momento recabados.

Su participación implica responder a una entrevista. De tal forma que se le pedirá que responda sobre datos personales. Las entrevistas se llevan a cabo en forma individual y confidencial. Esta información será totalmente confidencial, esto es será conservada de forma tal que usted no pueda ser identificado(a). Pudiera ser que dentro de las preguntas en el cuestionario o durante la entrevista, alguna de estas preguntas le hiciera sentir incómodo(a),

pero usted tiene todo el derecho de no responder a cualquiera pregunta que le incomode. Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o a lo largo del estudio a las personas encargadas del estudio.

7. Privacidad y confidencialidad.

La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o, (su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales serán guardados por separado para mantener la confidencialidad de sus respuestas a los cuestionarios y de los resultados de sus pruebas clínicas. Sus datos personales, sus cuestionarios, y sus resultados serán guardados en un archivero bajo llave en las oficinas del Dr. Ramón Gaxiola Robles investigador responsable. Sólo el equipo de investigación tendrá acceso a su información.

El equipo de investigadores y el médico que le realice el examen clínico, sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información sobre usted, o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia): o si lo requiere la ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, su nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarla/o no estará vinculada con la información que nos proporcione en la entrevista y con los resultados de sus estudios de gabinete y laboratorio. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos. Guardaremos toda su información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida 5 años después de concluir el estudio.

8. Personal de contacto para dudas y aclaraciones

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 20:00 h, de lunes a viernes con el Dr. Ramón Gaxiola Robles, que es el investigador responsable del área médica, a al teléfono: 612 3485229 o en el Hospital Central de Especialidades Médicas de la Paz, ubicado en Calle Delfines No. 110 Fraccionamiento FIDEPAZ en La Paz BCS, México.

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

No autorizo

Sí autorizo participar en el estudio y que se me tomen las muestras de sangre y musculo que se emplearan en el laboratorio para los estudios pertinentes.

Nombre del Participante

Firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que él/ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del Investigador

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre del Testigo 1.

Firma del Testigo

Fecha

Nombre del Testigo 2.

Firma del Testigo

Fecha (debe ser igual que la del participante)

12.4 Anexo IV. Estandarización de metodologías.

PNP

La estandarización de la determinación de la actividad de PNP se realizó utilizando el protocolo descrito por Chu *et al.* (1989). Este método se considera 10 veces más sensible en comparación con otros métodos espectrofotométricos que determinan la actividad de PNP mediante el monitoreo de la producción de ácido úrico (Bzowska *et al.*, 2000).

Se determinaron las condiciones óptimas (volumen de muestra y tiempo de análisis) para cuantificar la actividad de la enzima PNP en eritrocitos del tursión y de humano. La metodología de Chu *et al.* (1989) utiliza una cantidad considerable de muestra, por lo tanto, para la obtención y el lisado de eritrocitos se utilizó el protocolo descrito por Montero *et al.* (1995). Se realizaron los análisis utilizando volúmenes de 10, 20, 30, 40 y 50 μL de eritrocitos. Se determinó que el volumen óptimo para medir la actividad de PNP en eritrocitos de humanos y tursiones es de 20 μL (Fig. 14A). La linealidad de los datos se mantuvo hasta por más de 10 min. Sin embargo, durante el primer minuto la cinética enzimática es ligeramente inestable, y posterior de los 3 min comenzó a perderse la linealidad si se utilizan volúmenes menores o mayores a 20 μL de contenido intraeritrocitario (Fig. 14B). Por lo anterior, se recomienda capturar los datos a partir del minuto 1 y hasta el minuto 3. Las condiciones óptimas para cuantificar la actividad de PNP del tursión son las mismas que aquellas definidas para muestras de humanos (Fig. 15). Aunque la solución de

trabajo, en refrigeración y protegida de la luz, es estable por 3 días según Chu *et al.* (1989), se recomienda prepararla el mismo día, ya que después de 24 h de almacenamiento la solución se oxida y se torna rojiza.

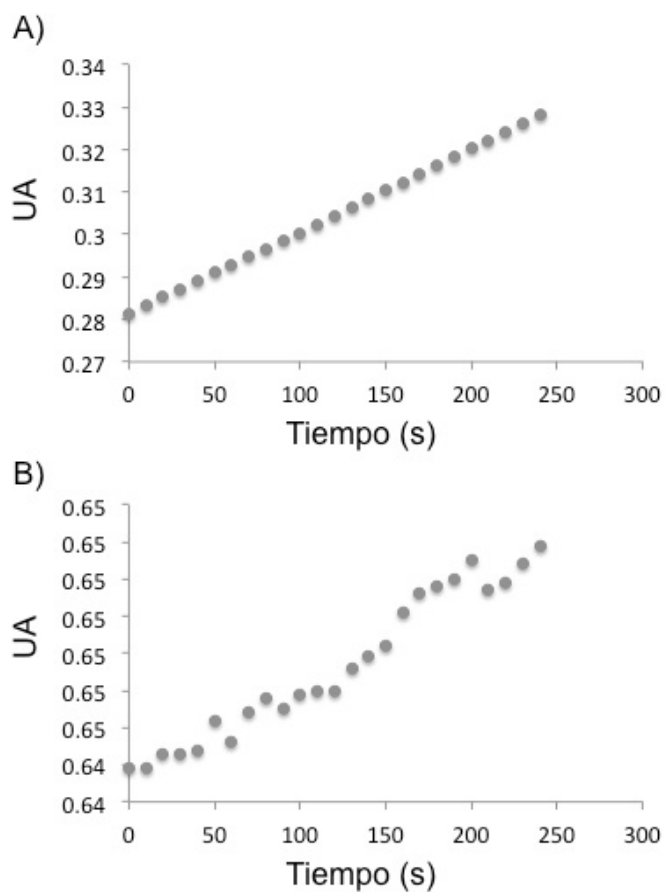


Figura 14. Cambio en la absorbancia por unidad de tiempo de la actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP) en el contenido intraeritrocitario de humano. Cinética enzimática con A) 20 µL de muestra, y B) 50 µL de muestra. Cada gráfica corresponde al cambio en la absorbancia de una muestra representativa. AU, unidades arbitrarias de absorbancia a 520 nm.

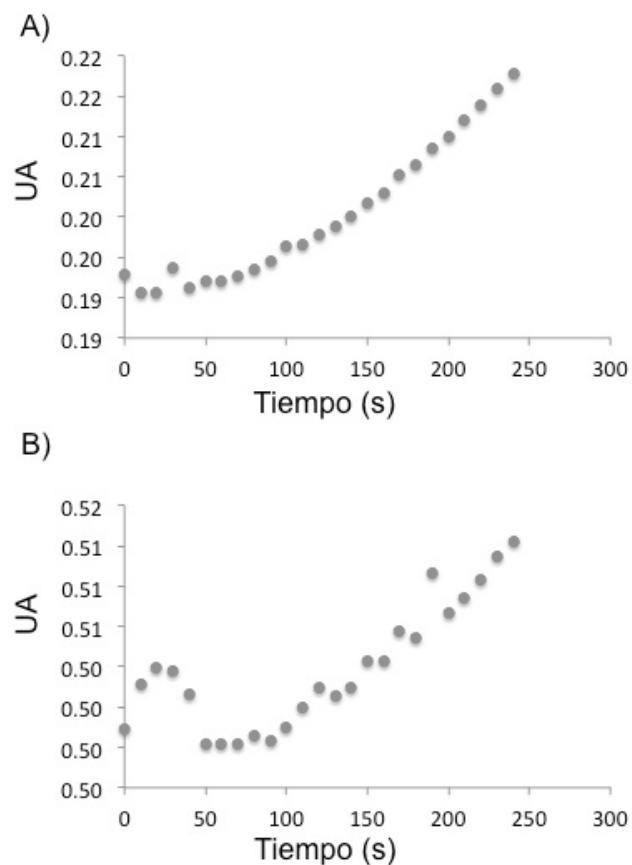


Figura 15. Cambio en la absorbancia por unidad de tiempo de la actividad de purina nucleósido fosforilasa (PNP) en el contenido intraeritrocitario de tursión (*Tursiops truncatus*). Cada gráfica corresponde al cambio en la absorbancia de una muestra representativa. Cinética enzimática con A) 20 µL de muestra, y B) 50 µL de muestra. AU: unidades arbitrarias de absorbancia a 520 nm.

Adicionalmente, se recomienda evitar la hemólisis durante la toma de la muestra debido a que en el plasma que visualmente presenta una coloración rojiza aumenta significativamente el cambio en la absorbancia durante la cinética enzimática.

Xantina oxidasa

En los eritrocitos de ambas especies la actividad de XO no pudo ser determinada debido a la interferencia del hierro y los grupos prostáticos hemo de la Hb con los colorantes fluorescentes (Fig. 17). Para determinar la actividad de XO en plasma, las muestras se probaron distintas diluciones: 1:10, 1:50 y 1:100. La dilución 1:10 fue la única que registró cambios significativos en la absorbancia (Fig. 16). Los registros del cambio de absorbancia cada 5 min mostraron fluctuaciones considerables. Debido a que existe la posibilidad de la formación de resorufina de forma espontánea por exposición a la luz y/o al aire (Zhao *et al.*, 2012), se recomienda medir únicamente la absorbancia inicial y final para la determinación de la actividad de XO.

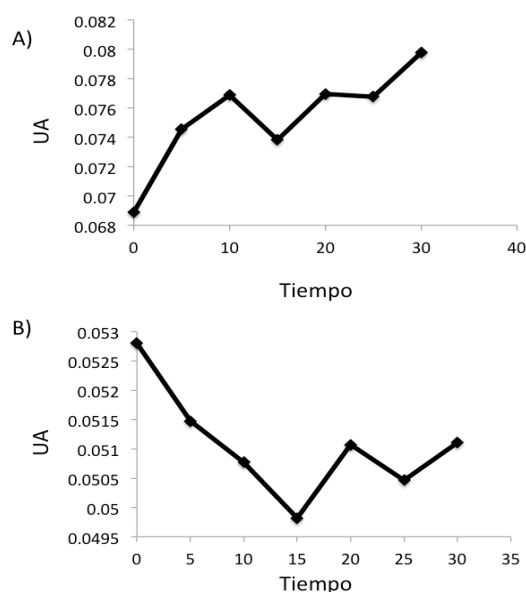


Figura 16. Actividad enzimática de xantina oxidasa (XO) en plasma de A) tursión (*Tursiops truncatus*) y B) de humano. Cada gráfica corresponde al cambio en la absorbancia de una muestra representativa. UA, unidades arbitrarias de absorbancia a 570 nm.

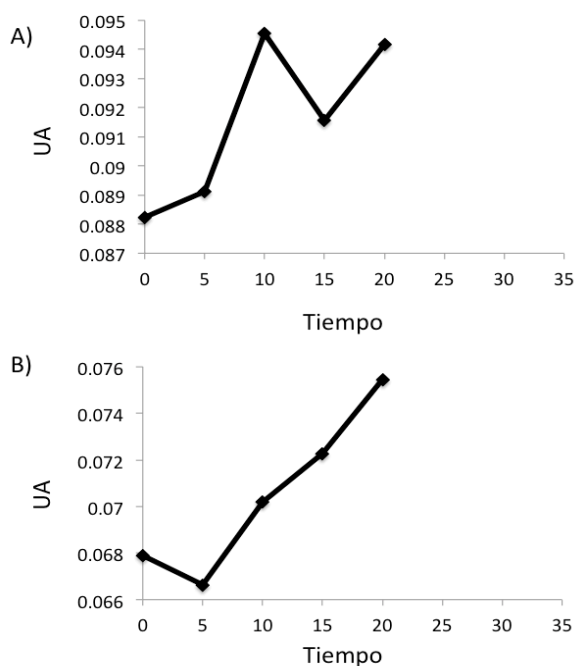


Figura 17. Actividad enzimática de xantina oxidasa (XO) en eritrocitos de A) tursión (*Tursiops truncatus*) y B) humano. Cada gráfica corresponde al cambio en la absorbancia de una muestra representativa. UA, unidades arbitrarias de absorbancia a 570 nm.

HGPRT

El análisis de la actividad de HGPRT en eritrocitos de tursiones se realizó de la manera que se describen en las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Debido a que la absorbancia inherente del plasma es distinta a los eritrocitos se realizaron pruebas utilizando 2, 3, 4 y 5 μL de plasma de tursiones y humanos. Se determinó que 4 μL es el volumen de muestra necesario para realizar los ensayos de actividad de HGPRT debido a que se registra un mayor cambio en la absorbancia y se mantiene la linealidad durante su monitoreo.

Para la determinación de la actividad de HGPRT en eritrocitos de humanos y tursiones se utilizó un volumen del lisado celular con un intervalo de absorbancia de 0.9 a 1.1 a 340 nm. Para las muestras de plasma de ambas especies se utilizó un volumen con un intervalo de absorbancia de 0.23 a 0.33 a 340 nm. Se monitoreó el cambio en la absorbancia durante dos horas, registrando los datos cada 5 minutos (Fig. 18 y 19).

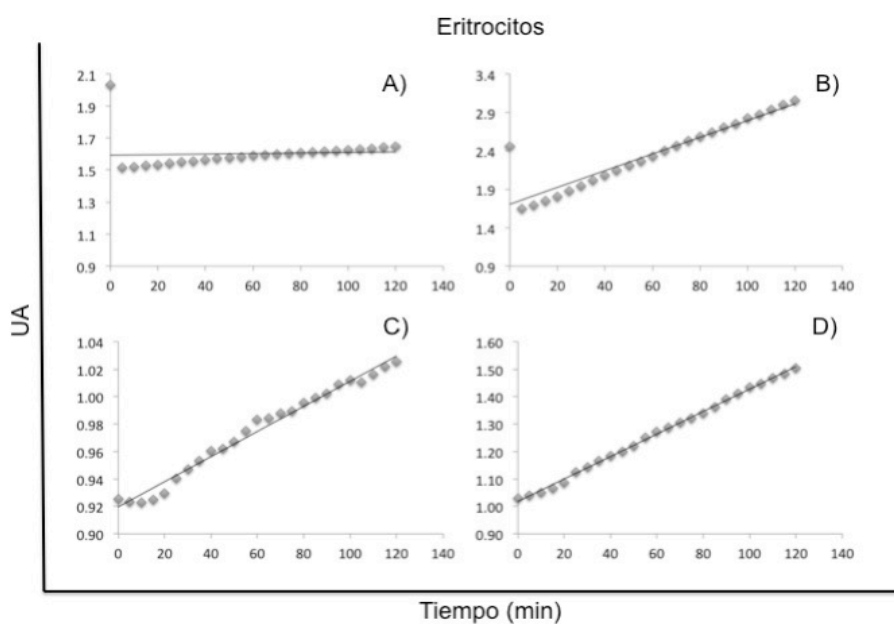


Figura 18. Cambio en la absorbancia por unidad de tiempo de la actividad de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) en eritrocitos de humano y tursión (*Tursiops truncatus*). Muestras representativas de eritrocitos de humano (A) control, (B) muestra, y de eritrocitos de tursión (C) control, (D) muestra. AU, unidades arbitrarias de absorbancia a 340 nm.

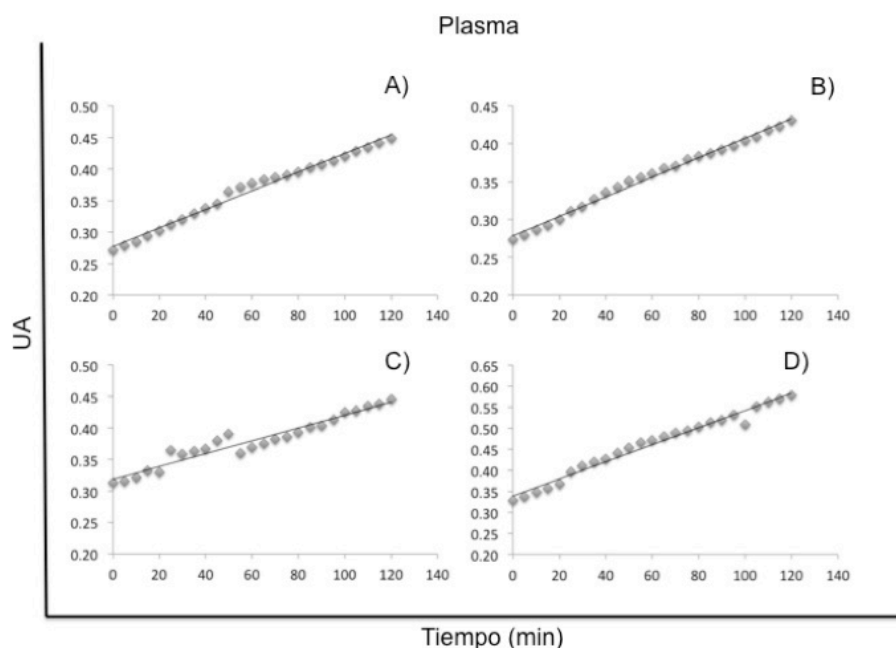


Figura 19. Cambio en la absorbancia por unidad de tiempo de la actividad de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) en plasma de humano y tursión (*Tursiops truncatus*). Muestras representativas de plasma de humano (A) control, (B) muestra, y plasma de tursión (C) control, (D) muestra. AU, unidades arbitrarias de absorbancia a 340 nm.

IMPDH

La determinación de la actividad de IMPDH se realizó utilizando los protocolos descritos por Montero *et al.* (1995) para el lisado de las células, el de Giannatasio *et al.* (2001) para el tratamiento de la muestra y las condiciones cromatográficas reportadas por Glander *et al.* (2003). Durante los primeros análisis no fue posible determinar la actividad enzimática. Por lo tanto, se modificaron los siguientes parámetros: la dilución de los eritrocitos de 1:6 a 1:2 (v/v), el tiempo de incubación de la reacción de 2 a 2.5 h, y en la solución amortiguadora B el metanol de 6 a 30%. Además, el flujo de la corrida se modificó en un intervalo de 1 a 1.6 mL min⁻¹ con variaciones de 0.1 mL min⁻¹ en

6 distintos análisis para determinar traslape de picos. Fue posible determinar la aparición de un pico correspondiente al tiempo obtenido en el análisis del estándar de XMP. La confirmación tuvo que determinarse en la muestra enriqueciéndola con el estándar de XMP debido a que el pico mostró un espectro de absorción distinto al del estándar.

La actividad de IMPDH se determinó de manera indirecta mediante la cuantificación de XMP. La actividad de IMPDH en plasma de humanos y tursiones estuvo por debajo del límite de detección de la técnica empleada. El tiempo de retención fue de 8.30 a 10 min. El espectro de absorción se modificó en un intervalo de 249.7 a 263.3 nm; por lo tanto, la revisión manual de este parámetro fue requerida para la identificación del XMP (Fig. 20).

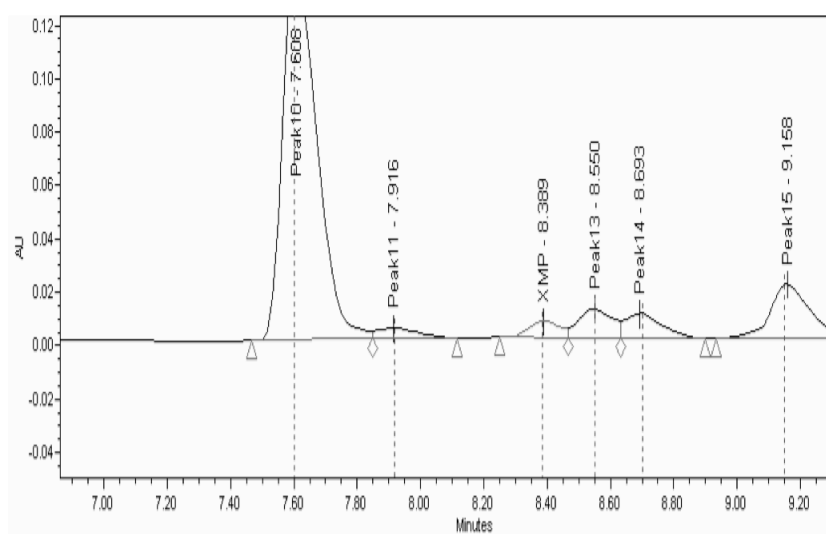


Figura 20. Cromatograma representativo de una muestra de eritrocitos de tursión (*Tursiops truncatus*) para la cuantificación de la actividad de IMPDH. A los 8.38 min se muestra el pico correspondiente a xantosina monofosfato (XMP). AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

Determinación de nucleótidos y purinas por HPLC

Según la metodología propuesta por Ally y Park (1992), los estándares deben ser tratados como la muestra (i.e. extracción alcalina). Por lo tanto, se preparó cada estándar a una concentración de 100 μM en 0.1 M de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4). Se desproteinizó con solución fría (6% HClO_4 , 0.5 mM EGTA), y se continuó el mismo tratamiento reportado para las muestras de eritrocitos. Las soluciones de la fase móvil de la cromatografía se prepararon de acuerdo a la metodología propuesta por Giannattasio *et al.* (2003). El reactivo para la formación de pares iónicos, tetrabutilamonio hidrógeno sulfato (TBAs) se sustituyó con tetrabutilamonio hidróxido, debido a la falta de disponibilidad del primero. Al analizar la corrida cromatográfica no se identificaron los picos correspondientes a los estándares, posiblemente porque al ajustar el pH con K_2CO_3 , éstos se diluyeron hasta 50 μM . Se prepararon los estándares diluyéndolos en agua destilada (dH_2O), como sugieren Giannatassio *et al.* (2003). Los estándares se prepararon a concentraciones de 1000 μM , y se analizó la corrida, logrando identificar los picos correspondientes a IMP, ATP, adenosina, NAD^+ e HX. No se identificó el pico correspondiente a xantina. La molécula precipita a temperatura ambiente, por lo que se recomienda calentar para disolver completamente antes de realizar el análisis. La xantina y el ácido úrico se calentaron 45°C hasta disolver completamente para preparar la curva de los estándares.

La línea base presentó fluctuaciones considerables debido a que durante el filtrado de la solución amortiguadora B se utilizó una membrana de nitrocelulosa, la cual se degradó por reacción con acetonitrilo, además se omitió la desgasificación de las fases móviles. Durante el filtrado de la solución amortiguadora se recomienda utilizar membranas de nylon para el filtrado de dicha solución, además de llevar a cabo la desgasificación para evitar el traslape de picos. No fue posible repetir la corrida por la disposición limitada de tetrabutilamonio hidróxido. La sustitución del TBAs por el tetrabutilamonio hidróxido, afectó mínimamente los tiempos de retención y elución de las purinas. La concentración utilizada para la preparación de las soluciones, fue de 6 mM de tetrabutilamonio hidróxido por disponibilidad del reactivo. Al realizar un análisis de blanco de reactivos, entre los minutos 4 al 6, se detectan señales que pueden corresponder a impurezas de los fosfatos, las señales no pudieron ser eliminadas aun utilizando reactivos con el 99% de pureza.

De manera general, las condiciones de cromatografía para la determinación de nucleótidos y purinas, en su mayoría, están basadas en la metodología descrita por Giannatasio *et al.* (2003). Sin embargo, fue necesario establecer ajustes en los parámetros de temperatura, flujo, pH, desgasificación y preparación de las fases móviles, entre otros (Tabla V).

Tabla V. Condiciones cromatográficas utilizadas para la estandarización de la determinación de 12 metabolitos de purinas. Se resaltan las condiciones que se emplearon para llevar a cabo el análisis de las muestras en el presente estudio.

Temperatura (°C)	Flujo (mL min ⁻¹)	Tiempo (min)	Pares iónicos	Tipo de elución	pH fases móviles	pH muestras
15	0.7	50	TBAs 6mM	Isocrática	6	6.5
16	0.8	40	TBAs 8 mM	Gradiente	6.5	7
20	0.9	35	TBAH 6mM		7	7.5
25	1	30	TBAH 8 mM			
28	1.1	26				
35	1.3	24				
Proporción de solvente orgánico (%)	Gradiente (% fase A-fase B)	Ácido úrico y xantina (calentar, °C)	Extracción alcalina (HClO ₄ , KOH, KH ₂ PO ₄) V	Sonicación (desgasificación, min)	Curva (µM)	Inyección muestra (µL)
5	100-100	35	1: 4: 1	5	100	10
20	100-10	40	1: 1: 1	15	50	20
30	100-50	45	1: 1: 1.5	20	25	30
50	50-100		0.5: 1: 1		12.5	40
	100-30		1: 1: 0.8		6.12	80
			1.15: 0.9: 0.9		3.06	
					1.03	

Una vez estandarizadas las corridas cromatográficas que permiten la identificación (por separado) de cada analito de interés, se realizaron los análisis cromatográficos para confirmar la identificación y el tiempo de elución de una mezcla de los estándares de HX, xantina, ácido úrico, inosina, IMP, adenosina, NAD⁺, AMP, ADP, ATP, GDP y GTP. Se identificaron los picos correspondientes a cada uno de los estándares inyectados y el tiempo de retención durante la corrida cromatográfica (Fig. 21). Los picos de los estándares se detectaron a los siguientes tiempos de retención, HX 3.07 min, xantina 3.31 min, ácido úrico 4.93 min, IMP 5.34 min, inosina 6.37 min, NAD⁺ 6.96 min, adenosina 8.23 min, AMP 9.27 min, GDP 10.1 min, ADP 12.6 min,

GTP 13.86 min y ATP 16.02 min. El tiempo de elución de la guanosina bajo las condiciones establecidas se traslapó con los picos del NAD⁺ e inosina. Para identificar de manera más precisa los analitos de purinas que eluyen entre el minuto 6 y 8, se excluyó a la guanosina de la mezcla de los estándares.

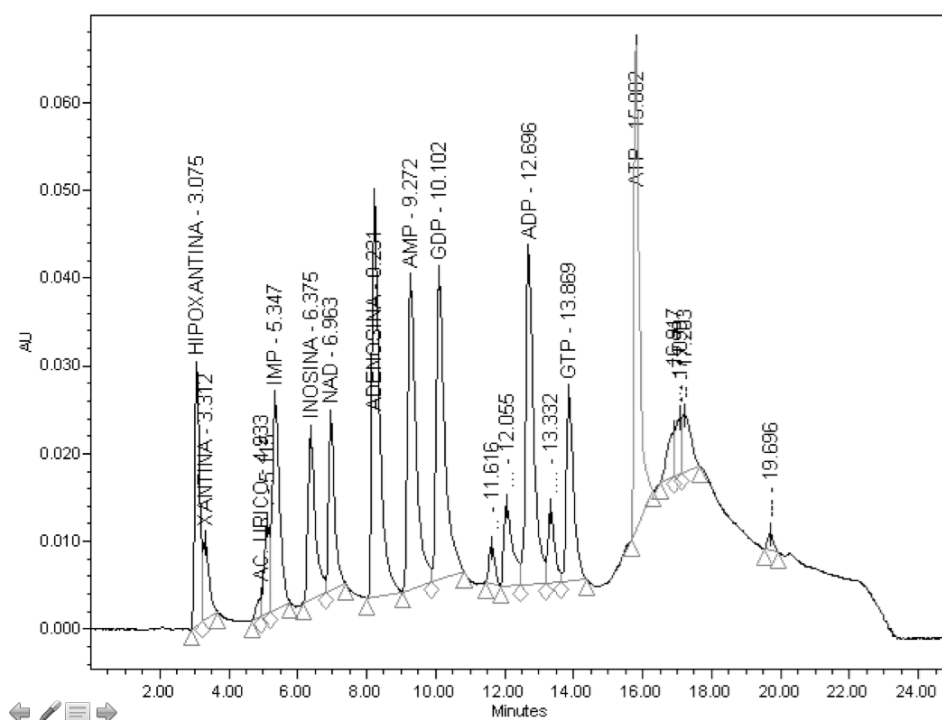


Figura 21. Cromatograma y tiempos de retención típicos de los estándares de hipoxantina (HX), xantina, ácido úrico, inosina monofosfato (IMP), inosina, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), adenosina, adenosina monofosfato (AMP), guanosina difosfato (GDP), adenosina difosfato (ADP), guanosina trifosfato (GTP), adenosina trifosfato (ATP) a 25 μ M cada uno y a 260 nm AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

La elución de cada pico de los estándares identificables a distintos tiempos confirma la eficiencia de la técnica para determinar los nucleótidos y derivados de purinas. El orden de elución de los estándares corresponden a los reportados por Giannattasio *et al.* (2003). Bajo las condiciones empleadas (i.e.,

flujo, 1.1 mL min^{-1} , 25°C), el tiempo de elución se desplaza aproximadamente por 30 s en comparación con lo reportado por Giannattasio *et al.* (2003). En las muestras de eritrocitos de humano fue posible identificar 7 metabolitos de purinas (Fig. 22). En los eritrocitos de tursión se identificaron 8 picos de los metabolitos de purinas (Fig. 23).

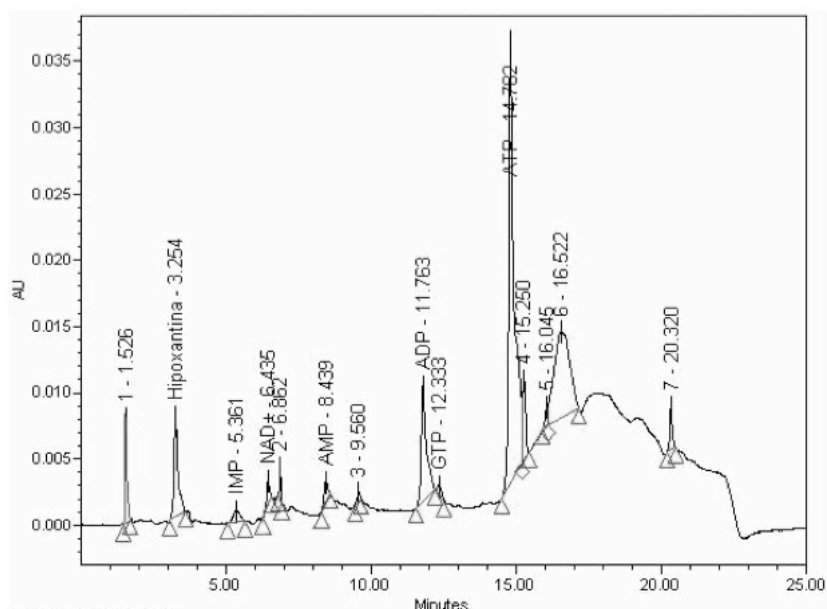


Figura 22. Cromatograma y tiempos de retención típicos del análisis de nucleótidos en una muestra representativa de eritrocitos de humano. Inosina monofosfato (IMP), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), adenosina difosfato (ADP), guanosina trifosfato (GTP), adenosina trifosfato (ATP) a 260 nm AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

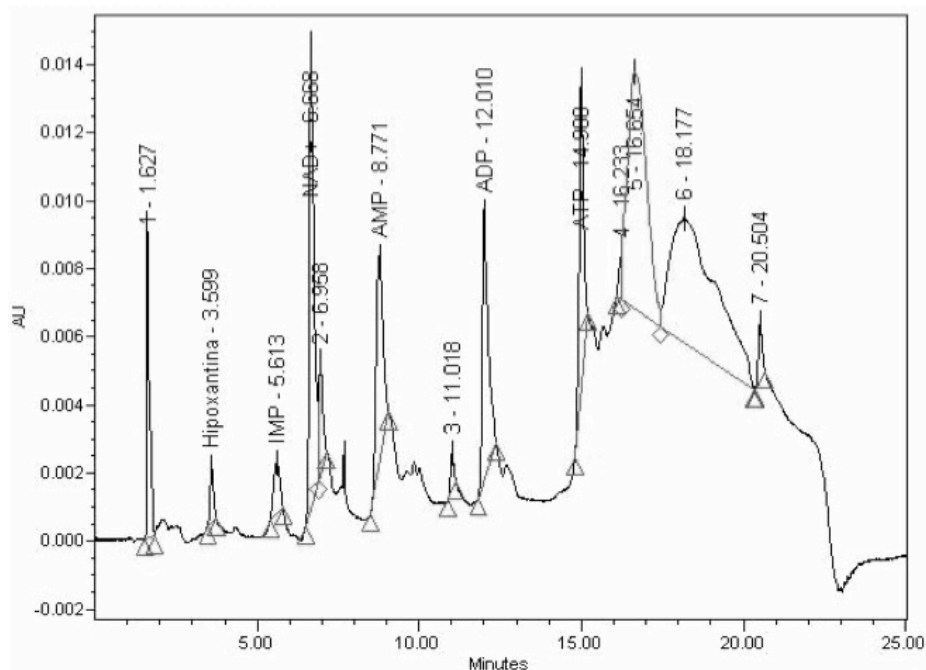


Figura 23. Cromatograma y tiempos de retención típicos del análisis de nucleótidos en una muestra representativa de eritrocitos de tursiones (*Tursiops truncatus*). Inosina monofosfato (IMP), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), adenosina monofosfato (AMP), guanosina difosfato (GDP, 3.11 min), adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) a 260 nm AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

En el plasma de humanos y tursiones se muestran fluctuaciones considerables en la línea base, sin embargo, fue posible identificar 12 metabolitos de purinas (Figs. 24 y 25, respectivamente).

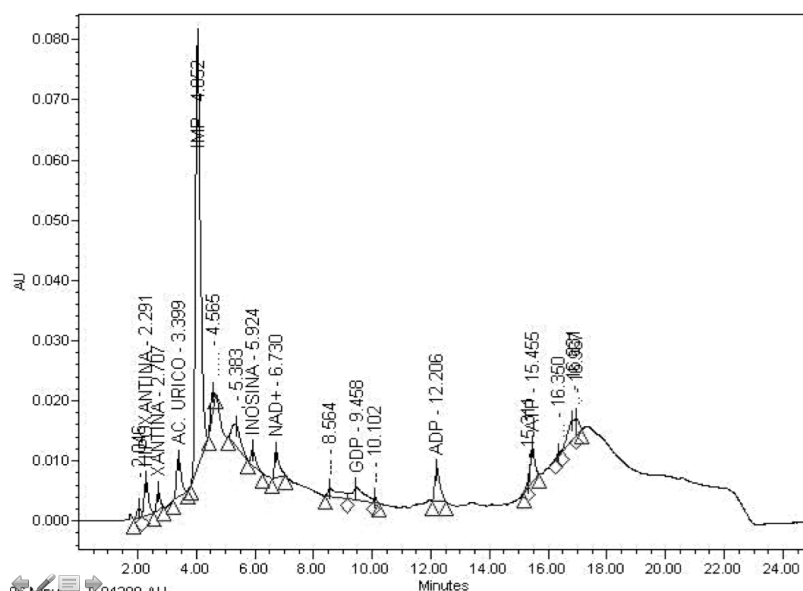


Figura 24. Cromatograma y tiempos de retención típicos del análisis de nucleótidos en una muestra representativa de plasma humano. Inosina monofosfato (IMP), inosina, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), guanosina difosfato (GDP), adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) a 260 nm AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

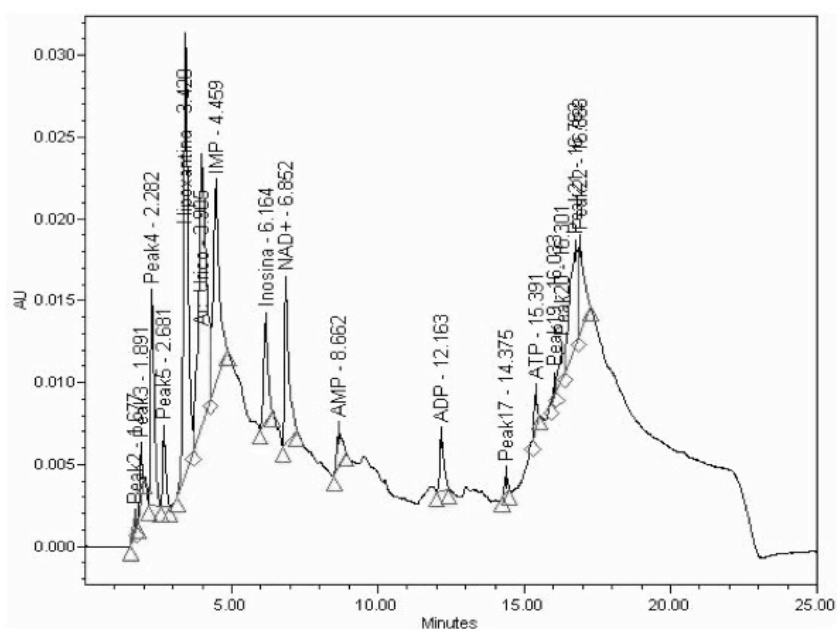


Figura 25. Cromatograma y tiempos de retención típicos del análisis de nucleótidos en una muestra representativa de plasma de tursión (*Tursiops truncatus*). Inosina monofosfato (IMP), inosina, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) a 260 nm AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

Para el análisis de las muestras de músculo de humano fue necesario estandarizar las condiciones del tratamiento de extracción de los metabolitos de purinas para este tejido (Fig. 26). Se utilizaron 2 muestras de músculo de cerdo (50 mg de tejido en 500 μ L y 1 mL de HClO_4 , 4M); el resto del procedimiento se realizó como en el caso de los eritrocitos. El procedimiento de análisis para las muestras de piel de humano (Fig. 27) y tursión (Fig. 28) se realizó de la misma manera que para el músculo de humano.

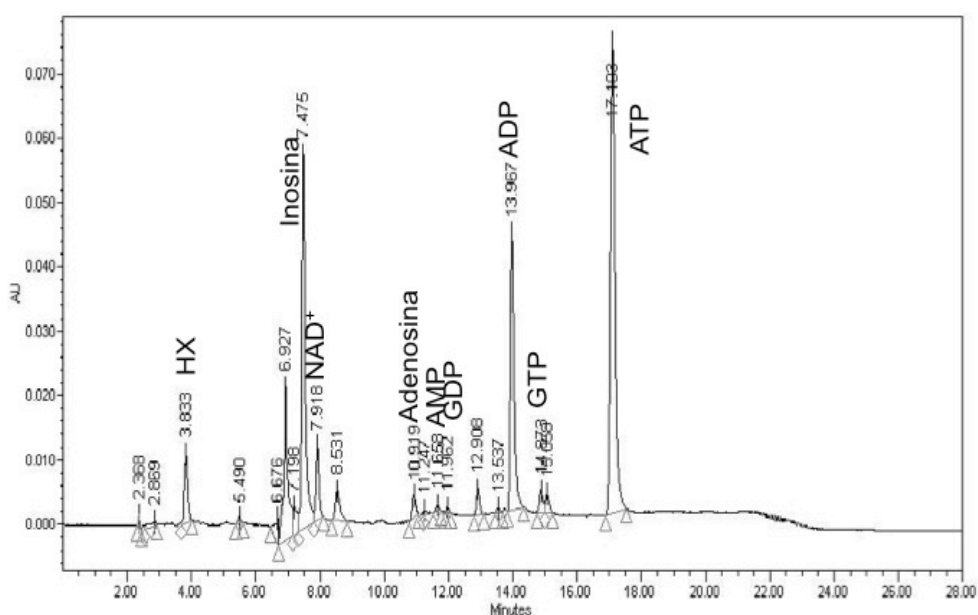


Figura 26. Cromatograma y tiempos de retención típicos del análisis de nucleótidos en una muestra representativa de músculo de humano. Hipoxantina (HX), nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), adenosina monofosfato (AMP), guanosina difosfato (GDP), adenosina difosfato (ADP), guanosina difosfato (GDP), adenosina trifosfato (ATP) a 260 nm AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

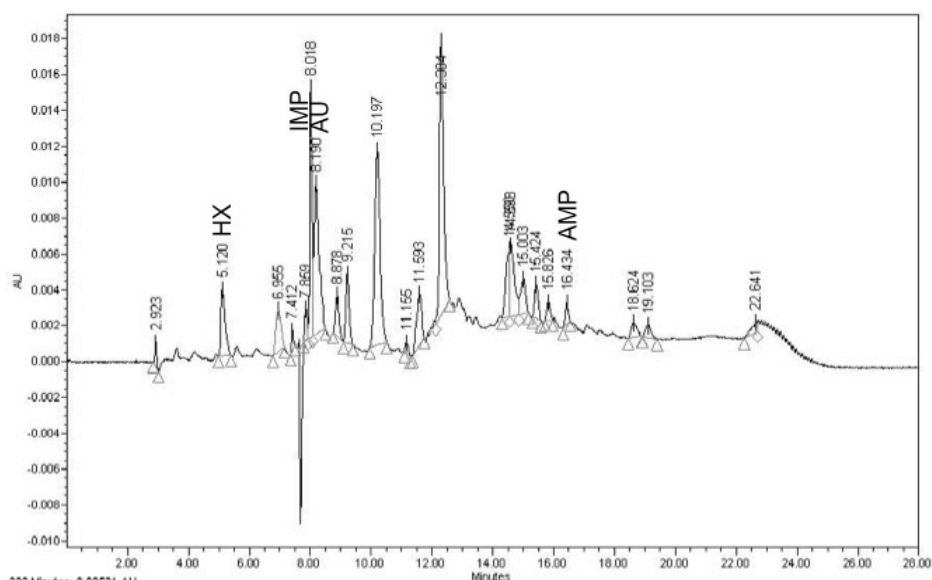


Figura 27. Cromatograma y tiempos de retención típicos del análisis de nucleótidos en una muestra representativa de piel de humano. Hipoxantina (HX), inosina monofosfato (IMP), ácido úrico, adenosina monofosfato (AMP), guanosina difosfato (GDP), adenosina trifosfato (ATP) a 260 nm AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

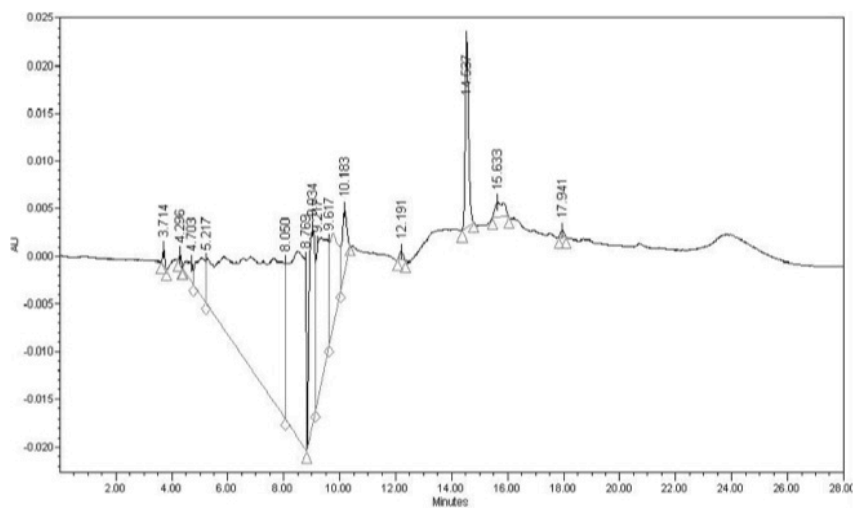


Figura 28. Cromatograma y tiempos de retención típicos del análisis de nucleótidos en una muestra representativa de piel de tursiops (*Tursiops truncatus*). AU, unidades arbitrarias a 254 nm.

Cultivo primario de células musculares (mioblastos) de humanos

Las muestras de músculo almacenadas a -80°C se descongelaron mediante un gradiente de temperatura. Primeramente se colocaron a -20°C durante 30 min, posteriormente se mantuvieron a 4°C y se trasladaron al laboratorio de Microbiología del CIBNOR. A partir de este momento todo el procedimiento se realizó en condiciones de asepsia dentro de una cabina de flujo laminar. El músculo se lavó con PBS 1X, se incubó en solución de lavado (PBS 1X, penicilina 10000 U y estreptomicina 10000 μg) durante 30 min. El tejido se colocó en una placa de Petri y se diseccionó en pequeños trozos de aproximadamente 1 mm^3 . Los trozos de músculo se colocaron frascos en "T" para cultivo celular de 25 cm^2 (Corning Inc., Corning, NY) y se cubrieron con 2 mL de medio de cultivo (medio Eagle modificado por Dulbecco 1X, L-glutamina 20 mM, piruvato de sodio 0.5 mM, suero bovino 1X, penicilina 10000 U, estreptomicina 10000 μg , HEPES 25 mM). Los frascos se transportaron a una incubadora a 37°C y se dejaron con la tapa ligeramente abierta para facilitar el intercambio gaseoso. El primer cambio de medio de cultivo se realizó a las 24 h de sembrar el tejido, posteriormente se cambió cada 48-72 h hasta alcanzar una confluencia del 90%.

El crecimiento celular fue monitoreado utilizando un microscopio invertido (Axiovert 100, Oberkochen, Germany). Los análisis de viabilidad y conteos celulares se realizaron por medio de tinciones con azul de

tripano, y utilizando un hemocitómetro y un microscopio compuesto. Anterior a la adición de HEPES los mioblastos no proliferaron, tampoco se encontró evidencia de división celular (Fig. 29)

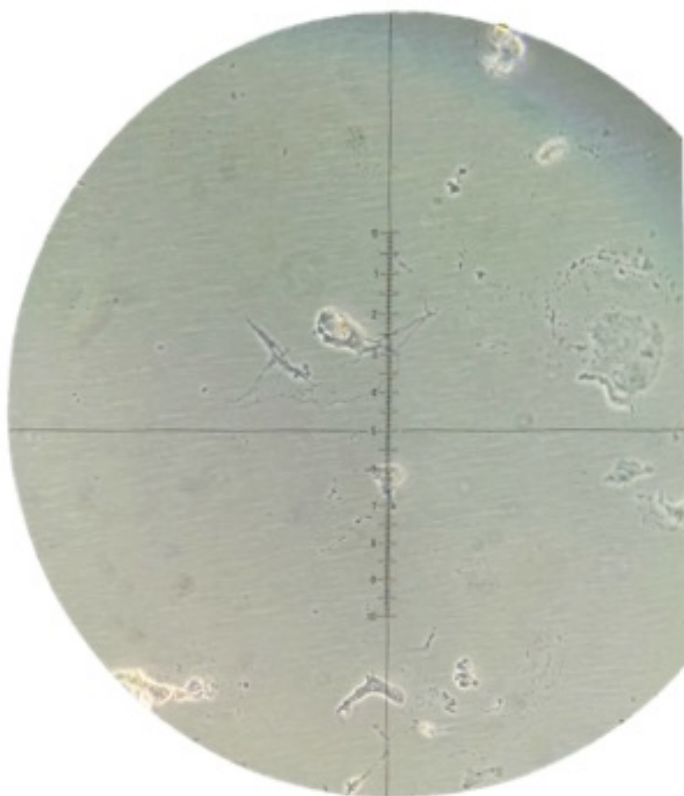


Figura 29. Fotografía a 10x de mioblastos de humanos después de 2 semanas de experimento.

Después de la adición de HEPES el pH se mantuvo alrededor de 7-7.5. Los mioblastos proliferaron y, aproximadamente a una semana del experimento, se alcanzó una confluencia del 70-90% (Fig. 30).

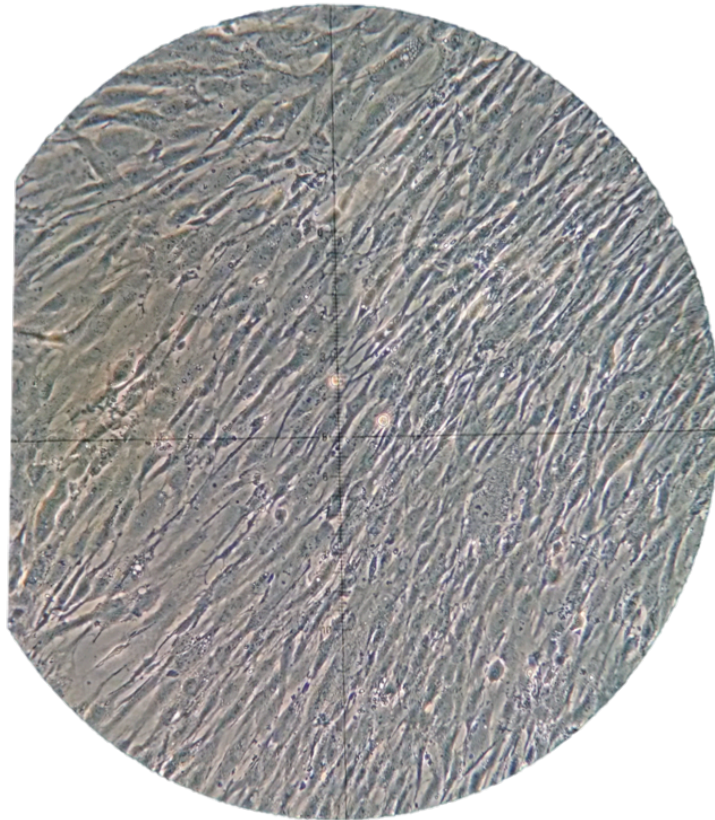


Figura 30. Fotografía a 10x de mioblastos de humanos después de 1 semana de experimento.

De manera general, se determinó que se alcanza una densidad de 1×10^6 de células en cada frasco de cultivo después de 1 semana de crecimiento (Fig. 31). El 95% de las células fueron viables, es decir, no incorporaron el colorante azul de tripano (Fig. 31).

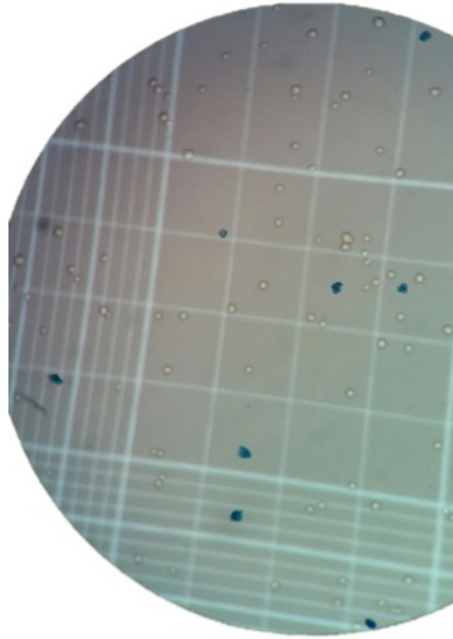


Figura 31. Análisis de viabilidad celular. Las células teñidas de azul son consideradas no viables. Las células que no incorporan el colorante son viables.