



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

METABOLISMO DE PURINAS EN CÉLULAS MUSCULARES EN  
RESPUESTA A EXPOSICIÓN A FTALATOS.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Karla Daniela Orozco Guerra**

La Paz, Baja California Sur, julio de 2022.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 05 del Mes de JULIO del 2022, 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:

**"Metabolismo de purina en células musculares en respuesta a exposición a ftalatos"**

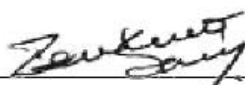
Presentada por el alumno:

**Karla Daniela Orozco Guerra**

Aspirante al Grado de MAESTRO 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 Zenteno Savín  
Director



Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Co-Tutor



Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Co-Tutor



Dra. Claudia J. Hernández Camacho  
Co-Tutor



**Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Directorade Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.**

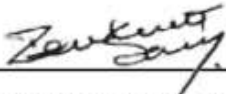
La Paz, Baja California Sur, a 07 de Julio de 2022.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante KARLA DANIELA OROZCO GUERRA del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate
- Filtros utilizados:  
1, Literatura citada
- Porcentajes de similitud:  
9%  
Se muestra captura de pantalla

Quotes Included		9%
Bibliography Included		SIMILAR
<b>Match Overview</b>		
1	Internet 237 words crawled on 03-Jul-2022 <a href="http://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a>	3%
2	Internet 35 words <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a>	<1%
3	Internet 31 words crawled on 08-Apr-2016 <a href="http://docente.ucol.mx">docente.ucol.mx</a>	<1%
4	Internet 30 words crawled on 02-Oct-2016 <a href="http://docs.com">docs.com</a>	<1%
5	Internet 25 words crawled on 06-Dec-2020 <a href="http://www.hispaviacion.es">www.hispaviacion.es</a>	<1%
6	Internet 20 words crawled on 30-Sep-2016 <a href="http://pt.scribd.com">pt.scribd.com</a>	<1%

**Firmas del comité**



Tania Zenteno Savín



Ramón Gaxiola Robles



Illie S. Racotta Dimitrov



Claudia J. Hernández Camacho

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Tania Zenteno Savín  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Directora de Tesis

Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor de Tesis

Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho  
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas  
Co-Tutora de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Tania Zenteno Savín  
Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov  
Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho

### **Jurado de Examen**

Dra. Tania Zenteno Savín  
Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

### **Suplente**

Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho

## Resumen

Las purinas son bases nitrogenadas de las que derivan ácidos nucleicos como la adenina, guanina e hipoxantina. Las purinas participan en procesos biológicos como la replicación de material genético, transcripción, síntesis de proteínas y metabolismo celular. Cuando las purinas no son metabolizadas adecuadamente, pueden desencadenar disrupción energética o patologías. La exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), sustancia aditiva en plásticos, puede alterar el metabolismo de purinas y generar perjuicios a la salud. El DEHP no se une químicamente al polímero, liberándose fácilmente al medio. Si los contaminantes asociados a plásticos, como los ftalatos, son disruptores endócrinos y pueden desencadenar daños en el ADN, incluyendo afectaciones a las bases purínicas, se espera que en las células musculares disminuyan los niveles de metabolitos de purinas en respuesta a la exposición a ftalatos. El objetivo de este trabajo fue cuantificar los niveles de los metabolitos de purinas en células musculares de humano en cultivo basal y evaluar su variación en respuesta a exposición a DEHP. Se colectaron biopsias de músculo esquelético de mujeres sometidas a cesárea programada para levantar cultivo primario de células. Una vez que las células musculares tuvieron >90% de confluencia, se expusieron a 1 mM de DEHP diluido en el medio de cultivo. Se cuantificaron las concentraciones de los metabolitos de purinas mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución, y se compararon los resultados entre tratamientos. Se observó una disminución en la concentración de hipoxantina (HX, de  $2.61 \pm 0.95$  a  $1.82 \pm 0.84$   $\mu\text{M}$ ), inosina (Ino, de  $0.7 \pm 0.36$  a  $0.4 \pm 0.14$   $\mu\text{M}$ ), adenosina (Ado, de  $0.11 \pm 0.4$  a  $0.053 \pm 0.04$   $\mu\text{M}$ ), guanosina-5'-trifosfato (GTP, de  $0.07 \pm 0.03$  a  $0.084 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ ), adenosina difosfato (ADP, de  $0.078 \pm 0.06$  a  $0.047 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ ) y adenosina trifosfato (ATP, de  $0.036 \pm 0.02$  a  $0.028 \pm 0.00$   $\mu\text{M}$ ) en las células de músculo esquelético expuestas a DEHP en comparación con aquellas mantenidas bajo condiciones control. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en las concentraciones de xantina (X, de 0.054 (0.05, 0.05) a 0.066 (0.05, 0.06)  $\mu\text{M}$ ), ácido úrico (de 0.04 (0.03, 0.03) a 0.08 (0.03, 0.06)  $\mu\text{M}$ ), monofosfato de inosina (IMP, de 0.020 (0.07, 0.26) a 0.27 (0.15, 0.34)  $\mu\text{M}$ ), dinucleótido de nicotinamida adenina ( $\text{NAD}^+$ , de 0.40 (0.23, 0.40) a 0.35 (0.02, 0.40)  $\mu\text{M}$ ), guanosín difosfato (GDP, de 0.22 (0.13, 0.32) a 0.18 (0.10, 0.21)  $\mu\text{M}$ ), y adenosín monofosfato (AMP, de 0.17 (0.03, 0.22) a 0.26 (0.02, 0.53)  $\mu\text{M}$ ). La concentración de guanosín trifosfato (GTP) fue mayor ( $0.084 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ ) en las células expuestas a DEHP en comparación con aquellas mantenidas bajo condiciones control ( $0.072 \pm 0.03$   $\mu\text{M}$ ). Estos resultados sugieren que en células musculares expuestas a DEHP la capacidad de reciclado y síntesis de purinas disminuye y que, por lo tanto, prevalece la ruta de degradación de purinas, disminuyendo los niveles de ATP en respuesta a la exposición a ftalatos. Estos resultados contribuyen a sentar las bases para proponer herramientas de diagnóstico y tratamiento para las afecciones asociadas a la exposición a ftalatos.

**Palabras clave:** ftalatos, mamíferos, purinas, una salud.

ORCID: 0000-0002-3760-8437



Dra. Tania Zenteno Savín  
Directora de Tesis

## Summary

Purines are nitrogenated bases from which nucleic acids such as adenine, guanine and hypoxanthine are derived. Purines are involved in biological processes such as genetic material replication, transcription, protein synthesis, and cellular metabolism. When purines are not metabolized properly, they can trigger energy disruption or pathologies. Exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), an additive substance in plastics, can alter purine metabolism and cause health damage. DEHP does not chemically bind to the polymer, easily releasing itself into the medium. If contaminants associated with plastics, such as phthalates, are endocrine disruptors and can trigger DNA damage, including affectations to the purine bases, muscle cells are expected to decrease levels of purine metabolites in response to phthalate exposure. The objective of this study was to quantify the levels of purine metabolites in human muscle cells in basal culture and to evaluate their variation in response to exposure to DEHP. Skeletal muscle biopsies were collected from women undergoing a scheduled cesarean section to initiate primary cell culture. Once the muscle cells had >90% confluence, they were exposed to 1 mM of DEHP diluted in the culture medium. Concentrations of purine metabolites were quantified using spectrophotometry and high-performance liquid chromatography, and results were compared between treatments. Decreased concentrations of hypoxanthine (HX, from  $2.61 \pm 0.95$  to  $1.82 \pm 0.84$   $\mu\text{M}$ ), inosine (Ino, from  $0.7 \pm 0.36$  to  $0.4 \pm 0.14$   $\mu\text{M}$ ), adenosine (Ado, from  $0.11 \pm 0.4$  to  $0.053 \pm 0.04$   $\mu\text{M}$ ), guanosine-5'-triphosphate (GTP, from  $0.07 \pm 0.03$  to  $0.084 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ ), adenosine diphosphate (ADP, from  $0.078 \pm 0.06$  to  $0.047 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ ) and adenosine triphosphate (ATP, from  $0.036 \pm 0.02$  to  $0.028 \pm 0.00$   $\mu\text{M}$ ) were observed in skeletal muscle cells exposed to DEHP compared to those maintained under control conditions. No significant differences were observed between treatments in the concentrations of xanthine (X, 0.054 (0.05, 0.05) to 0.066 (0.05, 0.06)  $\mu\text{M}$ ), uric acid (from 0.04 (0.03, 0.03) to 0.08 (0.03, 0.06)  $\mu\text{M}$ ), inosine monophosphate (IMP, from 0.020 (0.07, 0.26) to 0.27 (0.15, 0.34)  $\mu\text{M}$ ), nicotinamide adenine dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ , from 0.40 (0.23, 0.40) to 0.35 (0.02, 0.40)  $\mu\text{M}$ ), guanosine diphosphate (GDP, 0.22 (0.13, 0.32) to 0.18 (0.10, 0.21)  $\mu\text{M}$ ), and adenosine monophosphate (AMP, 0.17 (0.03, 0.22) to 0.26 (0.02, 0.53)  $\mu\text{M}$ ). The concentration of guanosine triphosphate (GTP) was higher ( $0.084 \pm 0.02$   $\mu\text{M}$ ) in cells exposed to DEHP compared to those maintained under control conditions ( $0.072 \pm 0.03$   $\mu\text{M}$ ). These results suggest that in muscle cells exposed to DEHP the capacity for recycling and synthesis of purines decreases and that, therefore, the purine degradation pathway prevails, decreasing ATP levels in response to exposure to phthalates. These results help lay the groundwork for proposing diagnostic and treatment tools for conditions associated with phthalate exposure.

**Keywords:** mammals, one health, phthalate, purines.

ORCID: 0000-0002-3760-8437



Dra. Tania Zenteno Savín  
Directora de Tesis

## **Dedicatoria**

A la MiniDanny, que ya no es tan Mini, por otro logro más. Después de ver tan lejano este día, con todo y pandemia, problemas de salud, trabajo duro y cambios personales, por fin llegó. A MiniDanny, la única que siempre soñó, batalló, y trabajó duro para que yo pudiera culminar esta etapa. La única que está realmente consciente de todos los malos y los tan, pero tan buenos momentos que pasamos en todos estos años de vida paceña. La que, a pesar de caminar por unos de sus años más cambiantes e incontrolables de su vida, puso todo lo que podía para lograr las metas que ya teníamos y terminar todos nuestros compromisos. La principal persona que hizo, hace y seguirá haciendo que todo sea posible. Y, por si fuera poco, la única que estoy segura leerá y releerá este trabajo con mucho orgullo... y burla. Esperemos que la próxima vez que leamos esto, veamos errores porque mejoramos tanto que podríamos volverla a escribir. Esta tesis es de mí, para MiniDanny, que ya no es tan Mini. Lo logramos, princesa, y continuaremos por más. Nunca olvides todo lo que hemos alcanzado.

## **Agradecimientos**

A CONACyT por la beca otorgada (1011046) y por el proyecto (Fronteras de la Ciencia 2016-01-2305) a partir del cual se obtuvo el financiamiento para este trabajo.

A CIBNOR por la oportunidad de realizar mis estudios de Posgrado en la Institución.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por las muestras otorgadas. Las muestras se colectaron bajo registro y permiso de la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (folio 2018-785-010) y del Comité de Ética en Investigación (CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601).

A mi Directora de Tesis, Dra. Tania Zenteno Savín, por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado bajo su tutela. Sobre todo por las facilidades otorgadas, su paciencia, enseñanzas y guía durante todo el proceso. A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Ramón Gaxiola Robles, Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov y Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho. Gracias por estar a la disposición de este proyecto y la oportunidad de realizar junto conmigo, sobre todo por sus consejos y observaciones durante todo el proceso.

A Orlando Lugo Lugo, técnico encargado del Laboratorio de Estrés Oxidativo. Gracias por el enorme apoyo durante la parte experimental de este proyecto, y por las largas jornadas durante el tiempo de experimentación, sin su ayuda no se hubiera logrado en tiempo y forma.

Al equipo del grupo de Estrés Oxidativo, por formar parte activa de este proyecto mediante observaciones y consejos en las juntas de Laboratorio.

Al personal de Posgrado por la disposición al realizar cada trámite y resolver cada duda a lo largo de estos años, especialmente a Horacio Sandoval Gómez por su amable y siempre dispuesta ayuda en cualquiera de las áreas que le eran posibles apoyar.

Agradezco de corazón a toda mi familia paceña. A mi grupo de Inklings: Karenina, Melicha y Pablito, por ser un gran apoyo emocional y siempre recordarme lo que valgo, me encanta estar



para ustedes cuando necesitemos consejos de vida. A Chulexis, por todo el apoyo brindando y la enorme amistad y cariño en tan relativamente poco tiempo. A mis amigas Alexandra y Brenda, por recordarme que las mujeres unidas valemos más y hacerme recuperar la confianza en las nuevas amistades. A Fernanda bebé, que se ha convertido en uno de mis grandes apoyos paceños, y espero poder retribuir todo lo que me das de corazón. A los Súper Conocidos: Iván, Ecuá, Andrea y Yahn, por hacerme la Amá más cool del barrio y por tantas anécdotas y pláticas filosóficas en cada ida a la ardilla. A Miguel por burlarse de mí y grabar en su memoria mis oscuros secretos, que a pesar de la distancia siga el mismo cariño. A todos, los quiero, gracias por hacer de mi vida paceña unas vacaciones.

Muchísimas gracias a Rafaello, por el apoyo en cada aspecto de mi vida, especialmente durante estos últimos años. Gracias por no quitar el dedo del renglón y mantenerlo junto al mío. Por todas las aventuras, viajes, buenos y malos momentos, y por ser mi banco personal cuando más lo necesitaba (jeje). Y sobre todo, gracias por los perrhijos que sin tus ánimos jamás hubiera tenido el valor de adoptar y hoy en día, agradezco. Puch's infinitos para tí.

Gracias a Ale Arroyitos, por tantos años de amistad incondicional y por más alejadas que estemos cada día, siempre seguir manteniendo el contacto y tratar de estar unidas, te quiero. A Marianis, que un año fue suficientes para forjar una amistad de toda la vida que valoro todos los días.

Por último, muchas gracias especiales a mi familia. A mis 3 madres: Gaby, Peque y Ana, y a mi papá Carlos. A mi tía Lupita, que directa o indirectamente, siempre estuvo al tanto de mí y me apoyado durante mi estancia acá. A Anacleto, por apoyo incondicional y acompañarme en toda mi vida, te espero por acá para vivir la vida paceña loca.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	vi
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	viii
<b>Glosario</b> .....	ix
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Ftalatos.....	1
1.2 Purinas.....	2
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Purinas.....	3
2.2 Daños a la salud causados por disrupción en el metabolismo de purinas.....	5
2.3 Ftalatos .....	6
2.4 Daños a la salud por exposición a ftalatos a nivel celular .....	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	16
5.1 Objetivo general .....	16
5.2 Objetivos particulares .....	16
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	17
6.1 Colecta de muestras.....	17
6.2 Análisis de muestras.....	18
6.3 Análisis estadístico .....	19
<b>7. RESULTADOS</b> .....	20
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	22
8.1 Músculo como muestra de estudio.....	22
8.2 Relación entre purinas y DEHP .....	22
8.3 Purinas en respuesta a la exposición a DEHP.....	23
8.4 Consecuencias ambientales .....	27
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	28
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	29
<b>11. ANEXOS</b> .....	39
ANEXO A. Concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de metabolitos de purinas.....	39

## Lista de figuras

- Figura 1.** Ruta metabólica de las purinas. La ruta de la síntesis *de novo* se representa por flechas planas, la vía de degradación de purinas por flechas punteadas, y el reciclado de purinas por flechas dobles. Gln: Glutamina; PRPP: Fosforribosil pirofosfato; Gly: Glisina; Glu: glutamina; Formil-THF: Formil tetrahidrofolato; THF: tetrahidrofolato; CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono; Asp: aspartato; XMP: xantosina monofosfato; IMP: iosina monofosfato; GMP, guanosin monofosfato; AMP: adenosin monofosfato; GDP: guanosin difosfato; dGDP: desoxiguanilato difosfato ATP: adenosín trifosfato; Ado: adenosina; Ino: iosina; Guo: guanosín; G: guanina; Ác. Úrico: ácido úrico. (Modificada de Gonzalo-Claros, 2010).....5
- Figura 2.** Vía metabólica de los ftalatos. Modificada de Chichizola et al., 2009. ....8

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Concentración ( $\mu\text{M}$ ) de los metabolitos de purinas en células musculares de humano (n= 5 mujeres) en cultivo primario bajo condiciones control y tras la exposición a di(2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM, 13 días).....	20
---	----

## Glosario

**Aducto:** Producto químico formado al final de una reacción de adición. Esta es una reacción en la que dos o más moléculas reaccionan y se combinan para formar un producto más grande.

**Biotransformación:** Proceso de modificación estructural de un tóxico una vez que se ha introducido en el cuerpo. Ocurre normalmente en el hígado a través de los procesos de oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación. Como consecuencia de la biotransformación se producen metabolitos inactivos, algunos de los cuales pueden tener actividad tóxica igual o distinta al xenobiótico inicial.

**Hipoxia:** Disminución del oxígeno disponible para las células. En consecuencia, al no poder sintetizar la energía necesaria a partir de los alimentos (carbohidratos, grasas y proteínas) mediante las reacciones oxidativas correspondientes, pueden producirse alteraciones en la función celular.

**Isquemia:** Reducción del flujo sanguíneo en los tejidos del cuerpo que disminuye la cantidad de oxígeno y nutrientes en la zona afectada; la falta de estos elementos puede desencadenar necrosis. La isquemia puede surgir en cualquier parte del cuerpo, pero los órganos más afectados en el humano suelen ser el corazón, el cerebro, el intestino y los dedos de las manos y los pies.

**Xenobiótico:** Compuesto químico extraño al organismo que puede ingresar a través de diferentes vías, incluyendo ingestión, inhalación o absorción por la piel o la mucosa intestinal. Estas sustancias pueden o no causar daño a células, órganos y tejidos dependiendo de su concentración y su capacidad de transformación en el organismo.

**Lista de abreviaturas**

Ado: Adenosina

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

ATP: Adenosina trifosfato

DEHP: Di(2-etilhexil) ftalato

GDP: Guanosina difosfato

GLN: Glutamina

GMP: Guanosina monofosfato, también conocido como 5'-ácido guanílico

GTP: Guanosina-5'-trifosfato

HP: Hipoxantina

IMP: Monofosfato de inosina, también conocido como ácido inosínico

Ino: Inosina

MEHP: Mono(2-etihexil) ftalato

NAD<sup>+</sup> = Dinucleótido de nicotinamida adenina

PRPP: Fosforribosil pirofosfato

ROS: Especie reactiva de oxígeno

X: Xantina

## 1. INTRODUCCIÓN

El número de contaminantes emergentes que se identifican como problemas ambientales crece cada año, y despierta un interés por el potencial riesgo para la salud. Entre los contaminantes emergentes que encabezan la lista aparecen los ftalatos. Los ftalatos pueden causar daños celulares, reproductivos y de crecimiento en humanos (Rusyn *et al.*, 2006). Además, procesos patológicos como obesidad o asma, alteraciones neurológicas como el autismo, y afecciones gastrointestinales también están relacionadas a la exposición a este contaminante (Sailas *et al.*, 2017; Badia-Tahull *et al.*, 2018). La exposición a ftalatos se ha asociado a algunos daños inmunológicos, induciendo inflamación y favoreciendo el estrés oxidativo en células (Robinson *et al.*, 2015). Al ser disruptores endócrinos, los ftalatos también pueden desencadenar daños al ADN, incluyendo afectaciones a las bases purínicas y a los metabolitos que se derivan de ellas.

### 1.1 Ftalatos.

Los ftalatos, como el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), son sustancias sintéticas utilizadas como aditivo en plásticos para darles una mayor flexibilidad. Plásticos como el policloruro de vinilo (PVC) y el tereftalato de polietileno (PET) contienen entre 20 y 40% (en peso) de DEHP (FDA, 2001). Los ftalatos o trazas de éstos se encuentran prácticamente en cualquier producto industrial, incluyendo pinturas y solventes, juguetes, botellas, productos de limpieza personal y equipo médico (Carlstedt *et al.*, 2013). Al no estar unidos covalentemente al plástico, los ftalatos se separan fácilmente y quedan biodisponibles, lo que puede provocar problemas ambientales y de salud (Wang *et al.*, 2019).

La exposición a DEHP induce estrés oxidativo, un disturbio en el balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes causando un daño oxidativo a moléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos, a las bases purínicas del ADN, y al ácido úrico; esos daños pueden ser reversibles o permanentes (Valko *et al.*, 2007). El metabolismo de purinas puede alterarse en respuesta a la exposición a DEHP (Glantzounis *et al.*, 2005).

## 1.2 Purinas

El metabolismo celular involucra una secuencia de reacciones bioquímicas reguladas para generar sustratos que son necesarios para los procesos celulares (King, 2015). Entre los metabolitos más abundantes en las células de mamíferos están las purinas. Las purinas son bases nitrogenadas de las que derivan ácidos nucleicos, como adenina, guanina e hipoxantina (Jurecka, 2009). Las purinas se encuentran como bases nitrogenadas libres o asociadas a una ribosa o desoxirribosa y participan en procesos biológicos, como la replicación genética y la síntesis de proteínas (Pedley *et al.* 2017). Con excepción de los protozoarios parásitos, todas las formas de vida sintetizan nucleótidos de purina (Rodwell, 2015).

Cuando las purinas no son metabolizadas adecuadamente, se pueden desencadenar condiciones patológicas. Varias patologías reportadas en humanos son causadas por anomalías innatas del metabolismo de purinas; entre éstas se incluyen anemia hemolítica inexplicable, artritis gotosa, síndrome de Lesch-Nyhan, y varios problemas renales (Contreras-Roura, 2012). Pese a la información sobre las enfermedades causadas en humanos por la falla en el metabolismo de purinas o por la exposición a ftalatos, los efectos e impactos a nivel celular son poco conocidos.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Purinas

En el estado basal de la célula o el organismo, la producción y degradación de purinas se mantienen mediante acciones coordinadas de síntesis *de novo*, catabolismo y reciclado (Fig. 1). La vía de síntesis *de novo* comienza en el citoplasma de los hepatocitos con la unión del anillo purínico sobre una molécula de ribosa-5-fosfato para después ser catalizada por glutamina fosforribosil pirofosfato (PRPP) (Fig. 1). El monofosfato de inosina (IMP), formado después de 11 reacciones, puede convertirse a través de dos vías distintas en adenosina monofosfato (AMP) o guanosina monofosfato (GMP). La vía que conduce a la síntesis de AMP requiere energía en forma de trifosfato de guanosina (GTP), mientras que la vía de GMP aprovecha la energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) (Vanbergen y Wintle, 2019).

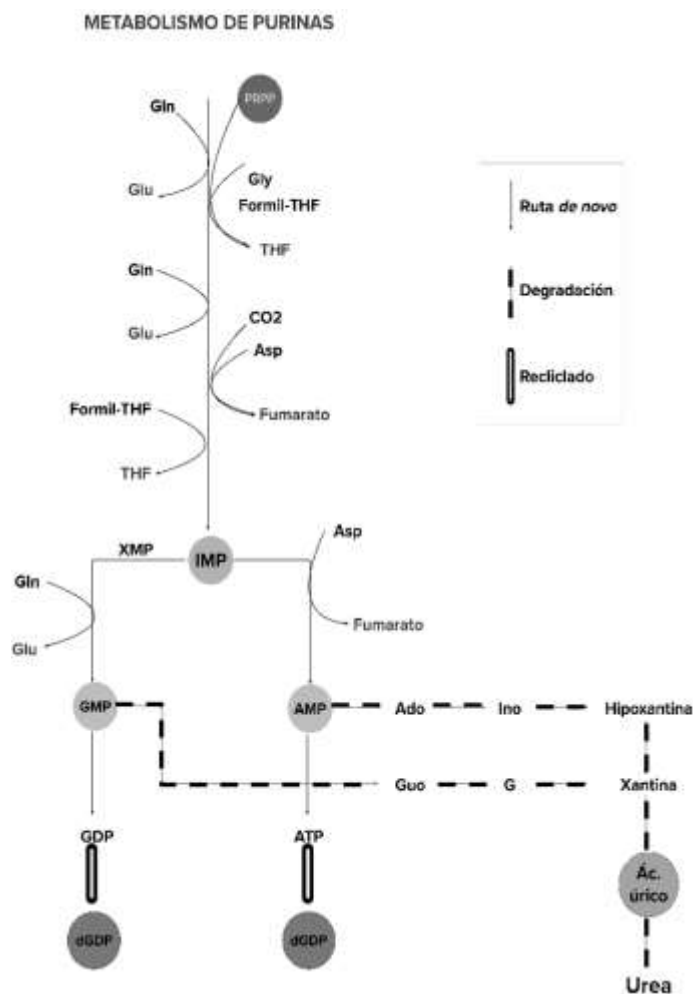
La degradación (catabolismo) de las purinas tiene lugar en dos fases, la descomposición del nucleótido a las bases libres hipoxantina (HX) o xantina (X), y la formación de ácido úrico (Fig. 1). En la primera fase, el grupo fosfato se escinde a través de la acción de una enzima nucleotidasa, y la ribosa-1-fosfato se separa por acción de la enzima nucleósido fosforilasa; al final, se libera el grupo amino; la HX se oxida a X, y la oxidación de X da origen al ácido úrico. La xantina oxidasa cataliza la hidroxilación de una serie de sustratos. Los más específicos son hipoxantina, que se transforma en xantina y ésta, a su vez, en ácido úrico (Vanbergen y Wintle, 2019). Aunque la síntesis y degradación de los nucleótidos de purina se producen en todos los tejidos, el ácido úrico sólo se sintetiza en los tejidos que contienen xantina oxidasa, especialmente el hígado y el intestino delgado (Burns y Wortmann, 2019).

En el catabolismo de purinas, la enzima xantina oxidoreductasa (XOR) cataliza la hidroxilación oxidativa de HX a X y posteriormente de X a ácido úrico (Fig. 1B) (Valko *et al.*, 2007). Al ácido úrico se le han atribuido propiedades tanto oxidantes como antioxidantes, dependiendo del sistema físico y la estructura química con la que reaccione. Por ejemplo, puede actuar como antioxidante y prevenir el efecto de los radicales libres; en la síntesis del ácido úrico se produce el radical libre anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y, así, se pueden iniciar procesos de estrés oxidativo. En el

ser humano, XOR es la única enzima que puede catalizar la síntesis de ácido úrico en condiciones fisiológicas (Harrison, 2002).

La producción de ácido úrico depende del contenido de purinas en los alimentos y de su eficiencia de degradación y reciclado. Dos a tres cuartos del ácido úrico se excreta a través de los riñones, y el resto a través de los intestinos (Burns y Wortmann, 2019). En humanos, una parte de este ácido úrico filtrado es reabsorbido a nivel renal en lugar de eliminarse (Valenzuela, 2016). Se sugiere que el ácido úrico participa en la respuesta inmune e inflamatoria, actuando como señal de peligro para las defensas celulares, siendo, en ese sentido, un coadyuvante endógeno (Ghaemi-Oskouie y Shi, 2011).

El reciclaje de purinas ocurre en un solo paso donde los ácidos nucleicos se descomponen a bases libres (Fig. 1). La vía de rescate recicla estas bases y las une de nuevo a ribosa-5-fosfato. Esta vía requiere menos pasos y gasto energético que la vía de síntesis *de novo*; por ello, en condiciones basales, casi el 90% de las purinas se sintetiza por este mecanismo (Vanbergen y Wintle, 2019). La vía necesita de las enzimas fosforribosil transferasas, las cuales son adenina fosforribosil transferasa (APRT), cuyos sustratos son adenina y PRPP, y su producto es AMP, e hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), que utiliza hipoxantina o guanina más PRPP para formar los nucleótidos correspondientes, IMP y GMP (Brandan y Aizpuru, 2003).



**Figura 1.** Ruta metabólica de las purinas. La ruta de la síntesis *de novo* se representa por flechas planas, la vía de degradación de purinas por flechas punteadas, y el reciclado de purinas por flechas dobles. Gln: Glutamina; PRPP: Fosforribosil pirofosfato; Gly: Glisina; Glu: glutamina; Formil-THF: Formil tetrahidrofolato; THF: tetrahidrofolato; CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono; Asp: aspartato; XMP: xantosina monofosfato; IMP: iosina monofosfato; GMP, guanosin monofosfato; AMP: adenosin monofosfato; GDP: guanosin difosfato; dGDP: desoxiguanilato difosfato ATP: adenosín trifosfato; Ado: adenosina; Ino: iosina; Guo: guanosín; G: guanina; Ác. Úrico: ácido úrico. (Modificada de Gonzalo-Claros, 2010).

## 2.2 Daños a la salud causados por disrupción en el metabolismo de purinas

El conocimiento del metabolismo de purinas ha incrementado gracias a los estudios sobre enfermedades innatas asociadas que se han reportado desde el siglo XX. Un estudio sobre metabolismo de las bases nitrogenadas en la obesidad inducida en ratas (Gómez-Ruiz, 1989) reportó un aumento en la síntesis *de novo* y una disminución en la degradación de purinas en el grupo experimental. Los autores concluyeron que las ratas que recibieron la dieta control tenían baja actividad de las enzimas reguladoras de X o HX, lo que llevó a un exceso de purinas

(Gómez-Ruiz, 1989). Éste es considerado uno de los primeros estudios sobre enfermedades asociadas al metabolismo de las purinas.

También se publicó una revisión de los errores innatos en el metabolismo de las purinas y otras patologías relacionadas que se conocían hasta la fecha (Contreras-Roura, 2012). Se recopilaron 27 defectos en el metabolismo de purinas con una variedad de sintomatologías, incluyendo inmunodeficiencias, trastornos neurológicos, anemia, retraso del crecimiento, obesidad e, incluso, cáncer. Se concluyó que las concentraciones de ácido úrico fuera de los intervalos de referencia pueden relacionarse con defectos en el metabolismo de purinas, lo que se asocia con patologías como la gota, artritis o inflamaciones inexplicables (Contreras-Roura, 2012). Si bien se asocian defectos en el metabolismo de purinas con enfermedades, hay evidencia que sugiere alguna ventaja evolutiva del ácido úrico. En humanos, una parte del ácido úrico filtrado es reabsorbido a nivel renal en lugar de eliminarse (Valenzuela, 2016). El ácido úrico participa en la respuesta inmune e inflamatoria, actuando como un coadyuvante endógeno (Ghaemi-Oskouie y Shi, 2011).

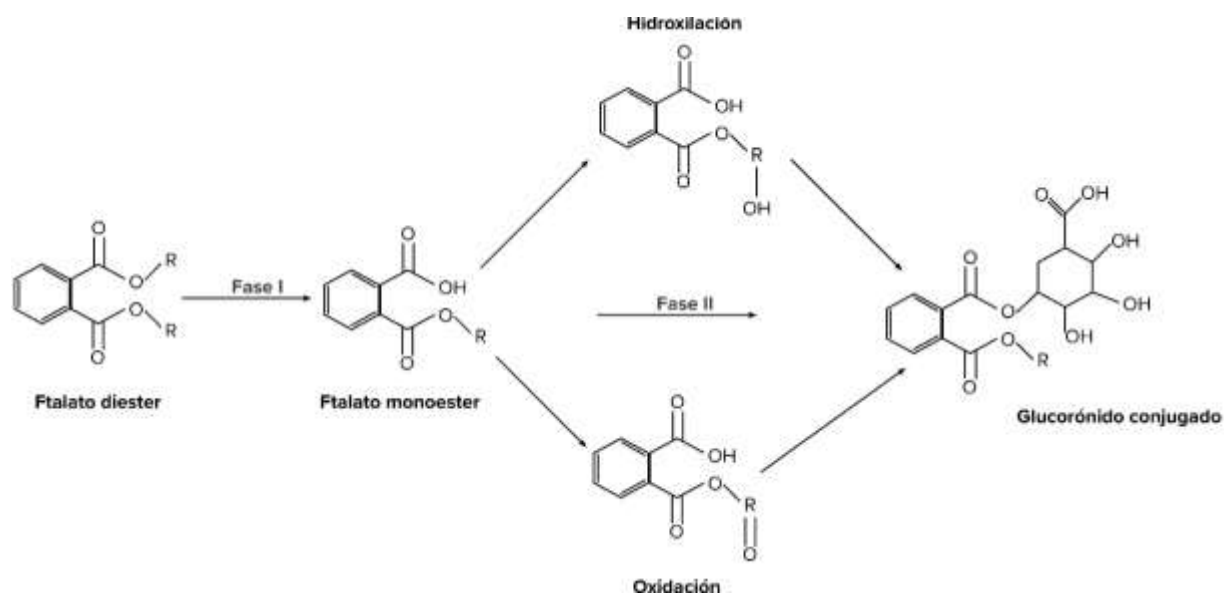
### **2.3 Ftalatos**

La exposición a DEHP se da a través del aire, el agua, el alimento y los materiales utilizados para empacarlo, así como por contacto con la piel (Petersen y Jensen, 2011). Vázquez *et al.* (2017) cuantificaron la concentración de ftalatos en botellas de agua de cuatro marcas mexicanas y evaluaron el efecto de la temperatura en la migración de los ftalatos del empaque al agua a través del tiempo. En tres de las marcas analizadas, el DEHP fue el ftalato con mayor presencia en el agua y en la botella, además de ser el único contaminante cuya concentración en el agua incrementó en todas las marcas después de 70 días (Vázquez *et al.*, 2017). En alimentos, la acumulación de ftalatos depende de la concentración lipídica del alimento *per se* (Badia-Tahull *et al.*, 2018). Otra de las fuentes de exposición es a través de los materiales utilizados en procesos médicos y quirúrgicos (Petersen y Jensen, 2011). Se encuentran ftalatos principalmente en los hemoderivados, en tubos endotraqueales y en equipos de infusión intravenosa (Luo *et al.*, 2014). Los individuos expuestos a técnicas como la hemodiálisis, trasplantes o cirugías presentan mayor grado de exposición a DEHP (Mallow y Fox, 2014).

Al entrar en contacto con el cuerpo, los ftalatos se distribuyen a través del sistema circulatorio y linfático (Fig. 2). En el hígado, los ftalatos se metabolizan en dos fases. En la primera fase, los diésteres de ftalatos se hidrolizan a su forma monoéster (Tsatsakis *et al.*, 2018). Durante la segunda fase, el ácido glucurónico se une al DEHP por glucuronidación. Además, puede pasar por otro proceso de biotransformación en el cual, por acción de lipasas gastrointestinales, se metaboliza a mono(2-etihexil) ftalato (MEHP) (Tsatsakis *et al.*, 2018). El MEHP es una de las formas más tóxicas de los ftalatos al cual se asocian la mayoría de las patologías que se han reportado con relación a este grupo de xenobióticos (Ortega-García *et al.*, 2002).

La principal vía metabólica de los ftalatos es la oxidación omega, la vía de oxidación metabólica de los ácidos grasos, que involucra al átomo de carbono más alejado del grupo carboxilo original. La  $\beta$ -oxidación puede metabolizar uno o más productos de oxidación omega; en este proceso, la cadena de carbono del ácido graso o el eje central del ácido graso se divide en dos pequeños fragmentos de carbono, que se metabolizan para producir energía (Ortega-García *et al.*, 2002).

Los ftalatos y sus metabolitos se desechan en la orina, pero también pueden distribuirse y acumularse en fluidos y órganos biológicos, como la leche materna, líquido amniótico, semen, saliva, sudor, cabello, uñas, el sistema circulatorio, reproductivo, endócrino y neuronal (Tsatsakis *et al.*, 2018). La capacidad de metabolizar el DEHP depende de la edad y del estado de salud del individuo. Aunque en humanos adulto aproximadamente el 85% de DEHP se excreta en la orina, en recién nacidos y prematuros la vía de conjugación con el ácido glucurónico aún no está completamente desarrollada y, por lo tanto, son propensos a acumular mayores cantidades de ftalatos (Barr *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Vía metabólica de los ftalatos. Modificada de Chichizola et al., 2009.

#### 2.4 Daños a la salud por exposición a ftalatos a nivel celular

Los ftalatos pueden causar daños celulares, reproductivos y de crecimiento en humanos (Rusyn *et al.*, 2006). La exposición a ftalatos se ha asociado a algunos daños inmunológicos, induciendo inflamación y favoreciendo el estrés oxidativo en células (Robinson *et al.*, 2015). Los sistemas reproductivos se consideran los más afectados por ftalatos (Wang *et al.*, 2019). Patologías como obesidad o asma, alteraciones neurológicas como el autismo, y afecciones gastrointestinales también están relacionadas a exposición con este contaminante (Sailas *et al.*, 2017; Badia-Tahull *et al.*, 2018).

Los ftalatos son considerados disruptores endócrinos, es decir, con capacidad de alterar el equilibrio hormonal de los organismos y causar problemas de salud, principalmente reproductivos (Badia-Tahull, 2018). Diferentes estudios realizados en mamíferos han asociado la exposición a DEHP y sus metabolitos a alteraciones en el aparato reproductivo. En ratas, la exposición perinatal a DEHP sugiere una relación a mutaciones como criptorquidia (testículo no descendido), células de Sertoli anormales, alteraciones en la producción de espermatozoides, disminución de testosterona, atrofia testicular y disminución del conteo de espermatozoides en el epidídimo (Foster *et al.*, 2000; Foster 2006). En ratas macho adulto, los signos observados tras

la exposición a DEHP fueron similares a aquellos en hombres con síndrome de hipoplasia testicular (desarrollo anormal de los testículos) (Parks, 2000), además de epididimitis, displasia de la próstata y vesículas seminales, así como malformaciones del pene (Dalsenter, 2006). El DEHP inhibe la síntesis y acelera la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, dañando el ciclo del ácido tricarbóxico (importante para la síntesis anaeróbica del ATP) y la gluconeogénesis, lo que resulta en una acumulación de ácido láctico y un suministro insuficiente de ATP en el microambiente de los testículos (Shen *et al.*, 2017).

En ratas hembra, la exposición a DEHP causa defectos de meiosis y disminuye la capacidad de fertilización de los ovocitos (Lu *et al.*, 2019), y en hembras preñadas expuestas a altas dosis del contaminante ( $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal por día durante 14 días), la pubertad de las crías se retrasó; estas alteraciones sugieren que la exposición a estos contaminantes durante la gestación y lactancia es más dañina que en cualquier otra etapa de vida (Mylchreest y Foster, 1998; Gray *et al.*, 2000; Grande, 2006). En humanos, se han reportado efectos similares. En varones, la exposición continua *in utero* a ftalatos se relacionó hasta en un 67% a una disminución en el tamaño del órgano reproductivo y menor calidad de esperma (Chen *et al.*, 2007).

La exposición a ftalatos está asociada a una disminución de la producción de testosterona, y a una reducción en la longitud de los conductos de Müller (lo que puede alterar el descenso transabdominal de los testículos hacia el escroto) y de los conductos de Wolf (National Toxicology Program, 1995). En mujeres se observan alteraciones ováricas manifestadas como pubertad precoz o endometriosis (Bustamante *et al.*, 2013). Se han reportado mayores concentraciones de DEHP en mujeres durante el embarazo y en la leche materna (Main *et al.*, 2006). Cuando una mujer embarazada recibe algún tipo de tratamiento médico que la expone a DEHP, como el uso de sondas nasogástricas, catéter central o a equipos fabricados con diferentes ftalatos en mezclas, el feto puede acumular ftalatos a través de la placenta, lo que aumenta el riesgo de estrés respiratorio y del desarrollo de patologías hepáticas (López-Espinosa, 2007).

La exposición continua a ftalatos también puede asociarse a daño al material genético. La exposición a ftalatos induce estrés oxidativo, que a su vez puede afectar el metabolismo de purinas y ADN espermático (Sikka y Wang, 2008). En ratones, el DEHP altera la síntesis y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y obstaculiza el suministro de ATP en los testículos (Shen *et al.*, 2017). El porcentaje relativo de DEHP excretado en forma de MEHP representa un tóxico bioactivo, ya que puede actuar como sustituto en la función enzimática de la fase I de replicación en el ADN espermático (Hauser, 2008). Los hombres con altos niveles de MEHP tienen niveles más altos de daño en el ADN del esperma debido a la reducción del metabolismo (desintoxicación) de otras moléculas genotóxicas (Hauser, 2008). Meeker *et al.* (2009) y Mendiola *et al.* (2011) han reportado una correlación negativa significativa entre los niveles de estradiol y andrógenos libres y la concentración de MEHP en orina. En Alemania, se probaron el DEHP y sus metabolitos y se encontró que tenían toxicidad espermática en hombres infértiles. Aunque el DEHP y sus metabolitos (MEHP, MEHP, MEPP) tienen concentraciones más altas ( $\Sigma=40.56 \mu\text{g L}^{-1}$ ), la distribución del semen no está relacionada con estos metabolitos (Herr *et al.* 2009). Sin embargo, los niveles de MEP y MEHP en la orina están asociados con un mayor daño al ADN de los espermatozoides, lo que sugiere que la exposición a ciertos ftalatos puede afectar la distribución de estos metabolitos en la población (Hauser *et al.*, 2007). Saidur *et al.* (2015) concluyeron que una exposición a 100  $\mu\text{M}$  de bisfenol A (BPA) disminuye el porcentaje de motilidad y el porcentaje de producción de ATP en el espermatozoide.

Existen estudios que correlacionan los niveles de DEHP con la actividad de enzimas antioxidantes. En un estudio en ratas albinas macho expuestas a DEHP, la expresión de insulina disminuyó, al igual que la captación y oxidación de la glucosa. Sin embargo, en el grupo de ratas que recibieron suplementación con vitaminas antioxidantes C y E no se observaron estos cambios inducidos por DEHP. Por lo tanto, se asocia a las vitaminas antioxidantes con un papel protector contra los efectos adversos del DEHP (Rajesh *et al.*, 2013). Además, la exposición al DEHP modula la actividad y la expresión génica de las enzimas catalasa y glutatión S-transferasa (GST) de *Daphnia magna* (crustáceo zooplanctónico), e induce el aumento en los niveles de peroxidación de lípidos y cambios en los niveles de transcripción de las enzimas (Wang *et al.*, 2018). En *Pimelodus maculatus* (bagre amarillo), la exposición a DEHP puede provocar un



aumento de peso relacionado con un daño hepático, acumulación de grasa y mal funcionamiento de aminoácidos (Mo *et al.*, 2019). Algunos estudios sugieren un tratamiento contra ftalatos a base de distintos antioxidantes. En ratas, se han realizado estudios donde el daño celular causado por ftalatos disminuyó significativamente (40%) a través de tratamientos con licopeno, un carotenoide que se encuentra principalmente en el tomate (Zhao, 2020), y estudios donde se previene la alteración espermatogénica inducida por el ftalato mediante el tratamiento con las vitaminas C y E (Ishihara *et al.*, 2001).

Tanto en humanos como en animales, además de los efectos reproductivos, se han reportado problemas de desarrollo pulmonar (Whyatt *et al.*, 2014), alteraciones gastrointestinales y neurológicas (Mallow y Fox, 2014), así como daños metabólicos (Casals-Casas, 2011) asociados a la exposición a ftalatos. En ratones expuestos a DEHP, el aumento del espacio aéreo terminal y la disminución del número de espacios y del área total disponible para el intercambio de gases son similares a lo reportado en bebés prematuros con displasia broncopulmonar (Magliozzi *et al.*, 2003). Un número creciente de estudios relacionan la exposición a ftalatos con los cambios patológicos que se observan en individuos con asma (Kolarik *et al.*, 2008; Whyatt *et al.*, 2014). En una evaluación del coeficiente intelectual de niños de 7 años con relación a la exposición a ftalatos se reportó reducción en la velocidad de procesamiento, el razonamiento perceptual, la memoria y la comprensión verbal (Factor-Litvak *et al.*, 2014). En ratones expuestos a DEHP se reportó una disminución de la inervación y la densidad de las células neuronales en áreas específicas del hipocampo (Smith *et al.*, 2011). En experimentos con ratas preñadas se observaron cambios en el desarrollo vascular del feto compatibles con características similares a aquellas que presentan pacientes con retinopatía del prematuro (Zei *et al.*, 2001).

Los ftalatos se clasifican como material favorable para la obesidad, ya que pueden alterar la vía de producción de grasas, el metabolismo de los lípidos o el equilibrio energético, provocando obesidad (Heudorf *et al.*, 2007). En los seres humanos, la concentración de los metabolitos de ftalatos se correlaciona generalmente con la obesidad abdominal (Stahlhut *et al.*, 2008). En términos de inmunidad, los ftalatos inducen inflamación e inhiben su resolución, lo que conduce al estrés oxidativo (Ferguson *et al.*, 2014). En individuos con nutrición parenteral se reporta que

el aumento de los niveles plasmáticos de DEHP están relacionados con el aumento en los niveles de malondialdehído, el cual se utiliza como indicador del daño oxidativo a lípidos (Kambia *et al.*, 2011).

La exposición a ftalatos está relacionada con patologías gastrointestinales. En conejos, después de tres semanas de exposición, se observó fibrosis, necrosis celular, hiperplasia de las vías biliares y otros cambios característicos de estrés oxidativo, como aumento en el número, grupos y formas atípicas de peroxisomas, así como mayores concentraciones del pigmento lipofuscina que, en algunos casos, puede usarse como indicador de estrés oxidativo (Loff *et al.*, 2007). En cuanto a la toxicidad hepática, se asume que el DEHP y ciertos compuestos con estructuras similares aumentan los indicadores del estrés oxidativo, como los niveles de peroxidación lipídica (Casals-Casas, 2011; Heindel *et al.*, 2017). En ratones, se ha observado hepatomegalia acompañada de cambios en la expresión de enzimas hepáticas y la aparición de cáncer de hígado asociado a daño oxidativo (Casals-Casas, 2011). Los cambios en la actividad de las enzimas metabólicas del hígado, especialmente las de la fase I y II de biotransformación de xenobióticos, pueden conducir a una mayor toxicidad de agentes endógenos y exógenos como fármacos (Casals-Casas, 2011). En un estudio en monos Rhesus (*Macaca mulatta*), la exposición a ftalatos se asocia al desarrollo de colestasis y la disminución en la excreción de bilirrubina (Jacobson *et al.*, 1977). Von Rettbert *et al.* (2009) concluyeron que cuando se utiliza un sistema de infusión que contiene PVC para nutrición parenteral en niños menores de dos años durante más de 14 días, el riesgo de desarrollar colestasis aumenta 5.6 veces.

A pesar de que se han reportado daños a la salud, los ftalatos siguen siendo de los aditivos más utilizados y considerados como una de las sustancias con baja toxicidad dentro de la industria de los plásticos (Bustamante-Montes *et al.*, 2001). En el 2015, el gobierno de Francia emitió un comunicado prohibiendo el uso de los ftalatos en la industria médica, sobre todo en el material utilizado en neonatos, pediatría y unidades de maternidad (Ley 2012-1442). En el 2017, la Regulación Europea de Sustancias Químicas catalogó como sustancias peligrosas y nocivas a cuatro variantes de los ftalatos, incluido el DEHP y sus metabolitos. Aun así, el valor de ingesta diaria recomendada para DEHP asignado en el 2014 sigue siendo de  $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ , basado en el

nivel de los efectos adversos observados, particularmente la toxicidad reproductiva en ratas. Este valor se encuentra por arriba de los niveles para otros disruptores endócrinos, lo que puede favorecer la ingesta accidental de dosis tóxicas de ftalatos (Royo-Bordonada, 2017).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Por sus propiedades y bajo costo, el DEHP es ampliamente utilizado en la fabricación de plásticos. Aunque el 85% de los ftalatos ingeridos son excretados por la orina, la cantidad de plásticos a los que se está expuesto día a día ocasiona que el porcentaje remanente de DEHP y MEHP origine problemas de salud (Duty *et al.*, 2005).

Los ftalatos inducen daño celular que puede desencadenar patologías en los sistemas respiratorio, reproductivo y endócrino, entre otros. Se ha asociado la exposición a DEHP y las patologías derivadas de ello a daño oxidativo (Badia-Tahull, 2018). Pese a la información sobre las patologías causadas en humanos, los efectos e impactos a nivel celular son poco conocidos. Los ftalatos pueden desencadenar daños al ADN, incluyendo afectaciones a las bases purínicas. Analizar la respuesta a la exposición a DEHP en células musculares de humano en cultivo celular ayudará a entender mejor el mecanismo de defensa a ftalatos, a comprender mejor los aspectos fisiopatológicos que intervienen en la interacción de estos contaminantes con el metabolismo de las purinas, y a sentar las bases para proponer herramientas de diagnóstico y tratamiento para las afecciones asociadas a la exposición a ftalatos.

#### 4. HIPÓTESIS

Si los contaminantes asociados a plásticos (DEHP) reducen los procesos de replicación celular, transcripción, síntesis de proteínas y metabolismo celular en los que participan las purinas, se espera que en células musculares la capacidad de síntesis y reciclado de purinas disminuya y que, por lo tanto, prevalezca la ruta de degradación de purinas, disminuyendo los niveles de ATP en respuesta a la exposición a ftalatos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar los cambios en el metabolismo de purinas en células musculares de humano en presencia de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) bajo condiciones de cultivo celular primario.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Cuantificar los principales metabolitos de la síntesis, degradación y catabolismo de purinas en células musculares de humano en cultivo primario bajo condiciones control.
- Cuantificar los principales metabolitos de la síntesis, degradación y catabolismo de purinas en células musculares de humano en cultivo primario en respuesta a la exposición a DEHP.
- Comparar los principales metabolitos de la síntesis, degradación y catabolismo de purinas en células musculares en cultivo primario entre tratamientos.
- Comprobar la relación entre DEHP y el metabolismo de purinas

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Colecta de muestras

Se colectaron muestras de músculo esquelético abdominal (0.5 g) de 5 mujeres donantes sometidas a cesárea programada en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), con ayuda de personal médico calificado. Los protocolos de muestreo y bioensayo fueron registrados en la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social registro folio 2018-785-010 y Comité de Ética en Investigación (CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601). Las muestras se enjuagaron con solución salina fisiológica, se almacenaron en crioviales en solución de transporte y se transportaron sobre hielo al laboratorio de Estrés Oxidativo del CIBNOR para establecer el cultivo celular inmediatamente.

Para la donación de muestras fueron consideradas mujeres adultas sanas en labor de parto por cesárea programada, no urgente. Se solicitó un seguimiento de su estado de salud los meses previos a la toma de muestra, un diagnóstico médico avalando su salud, y una carta de consentimiento informado (CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601). Individuos en condición de cesárea urgente, con enfermedades crónicas o que se rehusaron a firmar la carta de consentimiento, no fueron candidatas para donación. Los criterios de exclusión incluyeron aquellos sujetos diagnosticados previamente con diabetes, gota, hiperuricemia y anemia. La edad no fue criterio de exclusión. Las donantes fueron atendidas en el Hospital General de Zona No.1 del IMSS, ubicado en la Ciudad de La Paz, Baja California Sur, México.

Las muestras de músculo se sometieron a condiciones de cultivo primario. Las muestras se enjuagaron con solución salina fisiológica, se digirieron con una solución de colagenasa por 1 h a 37°C. Se detuvo el efecto con medio Ham F12, medio Dulbecco modificado de Eagle y suero fetal bovino. Se centrifugó a 300 x *g* por 10 min a 4°C; el pellet se suspendió en medio de cultivo y se colocó en una placa de cultivo durante 20-30 min. El sobrenadante se centrifugó a 300 x *g* por 10 min a 4°C; el pellet se suspendió otra vez en medio de cultivo, las células se sembraron en frascos T y se incubaron a 37°C.

Cada bioensayo fue preparado a partir de un lote de  $\geq 15$  frascos de cultivo celular (70 mL) en fase 3, confluencia celular de 95–100%, y densidad de mioblastos  $\geq 1.0 \times 10^6$  células mL<sup>1</sup> por frasco. Todas las células fueron reunidas en una suspensión y se sembraron  $4 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> en cada frasco. Para todos los cultivos se determinó la cobertura de la monocapa de células y confluencia celular. Debido a la distribución heterogénea de las células en algunos cultivos, el valor de confluencia fue determinado como aproximado y redondeado a decenas porcentuales (p. ej., 50%). Una vez que las células musculares tuvieron  $>90\%$  de confluencia, se expusieron a 1 mM de DEHP diluido en el medio de cultivo. De cada individuo, cinco frascos de cultivo se consideraron control y diez fueron expuestos a DEHP. Todos los frascos fueron incubados en las mismas condiciones (37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de humedad). Se realizó el recambio total de medio tres veces por semana y se revisó el desarrollo del cultivo bajo el microscopio. Aleatoriamente, se eligieron tres frascos de cultivo control y tres tratados con DEHP, se recuperó el total de células de cada frasco de cultivo y se monitoreó su viabilidad celular. Transcurridos 13 días, se finalizó el bioensayo. Se recuperó el material biológico de todos los frascos mantenidos bajo condiciones control y expuestos a DEHP; todas las células fueron reunidas en una suspensión para cada tratamiento. La suspensión celular de cada tratamiento por individuo fue conservada a -80°C hasta su posterior análisis. Se cuantificó la concentración de los metabolitos de purinas mediante espectrofotometría y cromatografía de alta resolución con detección UV y se compararon los resultados entre tratamientos (control, exposición a DEHP).

## 6.2 Análisis de muestras

El procesamiento de las muestras se realizó con base en los procedimientos de acuerdo con el método de Giannattasio *et al.* (2003). Este método consistió en separar nucleótidos y bases purínicas a través de una cromatografía líquida de fase reversa (HPLC) por pares iónicos. La cromatografía por pares iónicos permitió el uso de columnas de separación con resina unida a octadecil (Phenomenex C18®), las cuales retienen los compuestos de adenina y sus derivados; además, brindan resolución y determinaciones consistentes. La identificación de los picos correspondientes a cada metabolito se realizó con base en el tiempo de retención por el C18 (mismo que es proporcional al peso molecular) y el espectro de absorción a partir de una curva de calibración que incluyó todos los analitos de interés.



Se cuantificó la concentración de los metabolitos de purinas HX, X, ácido úrico, IMP, inosina, adenosina, nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), AMP, adenosín difosfato (ADP), ATP, guanosín difosfato (GDP) y GTP mediante HPLC reportados por Giannattasio *et al.* (2003). Para cuantificar la concentración de cada metabolito, se comparó con una curva de calibración con la mezcla de estándares a concentraciones conocidas (5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.375, y 0.015  $\mu\text{M}$  más un blanco). Las muestras se ajustaron a pH 6.5 con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ; 0.5 M) frío para extraer los metabolitos; posteriormente, se neutralizó con 180  $\mu\text{L}$  hidróxido de potasio (KHO; 0.5 M) y 180  $\mu\text{L}$  de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_2$ ; 1M, pH 7.5). Una vez que se obtuvo el extracto, se filtró a través de una membrana Millipore© de 0.22  $\mu\text{m}$ , se colocó en un vial para HPLC y se analizó por duplicado. Se utilizó una columna ODS hypersil 125 x 4.6 y una solución amortiguadora (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM TBA, pH 6.9, a temperatura ambiente). La identificación de los metabolitos se realizó con base en la longitud de onda y tiempo de retención de cada uno. La concentración se calculó a partir de la ecuación de la recta ajustada a la curva estándar y del área de los picos correspondientes a cada nucleótido y metabolito de interés. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$  de proteína.

### 6.3 Análisis estadístico

Todos los datos se sometieron a pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (C de Cochran). Para los datos que siguieron una distribución normal, las concentraciones de metabolitos se reportan como promedio y desviación estándar; en este caso, para la comparación entre tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una 1 vía (Wayne, 2010). Para los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad, los resultados se reportan como medianas y percentiles, y se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Wayne, 2010). En todos los casos, la significancia estadística se consideró cuando  $p < 0.05$  (Zar, 2009). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa Statistica®.

## 7. RESULTADOS

La concentración de metabolitos de purinas en las células de cultivo de músculo esquelético de humanos se resume en la tabla I. Se detectó el total de metabolitos seleccionados en todas las muestras; tanto en las células que se mantuvieron bajo condiciones control como las que fueron expuestas a DEHP. Los metabolitos que se encontraron en mayor concentración tanto en condiciones basales como en las células expuestas a DEHP fueron GDP y HX; los que se encontraron en menor concentración en condiciones basales y en las células expuestas a DEHP fueron ATP y ácido úrico (Tabla 1).

**Tabla 1.** Concentración ( $\mu\text{M}$ ) de los metabolitos de purinas en células musculares de humano ( $n= 5$  mujeres) en cultivo primario bajo condiciones control y tras la exposición a di(2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM, 13 días).

	Condiciones control	Exposición a DEHP	Valor $p$
<b>HX</b>	<b>2.61 <math>\pm</math> 0.95</b>	<b>1.82 <math>\pm</math> 0.84</b>	<b>0.001 *</b>
<b>X</b>	0.054 (0.05, 0.05) <sup>13</sup>	0.066 (0.05, 0.06)	0.128
<b>Ác. Úrico</b>	0.04 (0.03, 0.03)	0.08 (0.03, 0.06)	0.156
<b>IMP</b>	0.20 (0.07, 0.26)	0.27 (0.15, 0.34)	0.141
<b>Ino</b>	<b>0.7 <math>\pm</math> 0.36</b>	<b>0.4 <math>\pm</math> 0.14</b>	<b>0.001 *</b>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	0.40 (0.23, 0.40)	0.35 (0.28, 0.40)	0.143
<b>GDP</b>	0.22 (0.13, 0.32)	0.18 (0.10, 0.21)	0.447
<b>AMP</b>	0.17 (0.03, 0.22)	0.26 (0.02, 0.53)	0.062
<b>Ado</b>	<b>0.11 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>0.053 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>0.05 *</b>
<b>GTP</b>	<b>0.072 <math>\pm</math> 0.03</b>	<b>0.084 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>0.038 *</b>
<b>ADP</b>	<b>0.078 <math>\pm</math> 0.06</b>	<b>0.047 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>0.004 *</b>
<b>ATP</b>	<b>0.036 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>0.028 <math>\pm</math> 0.00</b>	<b>0.023 *</b>

HX= hipoxantina, X= xantina, Ác. úrico = ácido úrico, IMP= inosina monofosfato, Ino = Inosina, NAD<sup>+</sup>= nicotinamida adenina dinucleótido, GDP= guanosín difosfato, AMP= adenosina monofosfato, Ado= adenosina, GTP= guanina trifosfato, ADP= adenosín difosfato, ATP= adenosina trifosfato. Los resultados que presentaron distribución normal se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar, los resultados que no presentaron una distribución normal se presentan como medianas y percentiles (25-75). \*  $p < 0.05$ , comparación entre tratamientos.

Las concentraciones de HX, inosina, adenosina, GTP, ADP y ATP fueron mayores en las células de músculo esquelético mantenidas bajo condiciones control que en las células expuestas a DEHP. Las concentraciones promedio de HX en células de músculo esquelético en condiciones control fueron de  $2.61 \pm 0.95 \mu\text{M}$  y tras la exposición a DEHP fueron  $1.82 \pm 0.84 \mu\text{M}$  ( $p= 0.001$ ); es decir,

30.27% menores que bajo condiciones control. El promedio de las concentraciones de inosina en células de músculo esquelético disminuyó de  $0.7 \pm 0.36 \mu\text{M}$  bajo condiciones control a  $0.4 \pm 0.14 \mu\text{M}$  (-42.86%) tras la exposición a DEHP ( $p= 0.001$ ). El promedio de las concentraciones de Ado en células de músculo esquelético disminuyó de  $0.11 \pm 0.04 \mu\text{M}$  bajo condiciones control a  $0.053 \pm 0.04 \mu\text{M}$  tras la exposición a DEHP (-51.82%) ( $p= 0.05$ ). Las concentraciones promedio de ADP en células de músculo esquelético fueron  $0.078 \pm 0.06 \mu\text{M}$  bajo condiciones control y disminuyeron 39.74%, a  $0.047 \pm 0.02 \mu\text{M}$ , tras la exposición a DEHP ( $p= 0.004$ ). Las concentraciones promedio de ATP en células de músculo esquelético en condiciones control fueron de  $0.036 \pm 0.02 \mu\text{M}$  y después de la exposición a DEHP de  $0.028 \pm 0.00 \mu\text{M}$  (-22.22%) ( $p= 0.023$ ). Las concentraciones promedio de GTP en células de músculo esquelético en condiciones control fueron de  $0.072 \pm 0.03 \mu\text{M}$  y tras la exposición a DEHP fueron  $0.084 \pm 0.02 \mu\text{M}$  ( $p= 0.038$ ); es decir, 16.77% mayor en presencia de DEHP que bajo condiciones control. Este metabolito fue el único que presentó una mayor concentración tras los efectos del ftalato que en condiciones basales.

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de X, ácido úrico, IMP,  $\text{NAD}^+$ , GDP y AMP en células musculares en cultivo celular bajo condiciones control y tras la exposición a DEHP. Las concentraciones de X en células de músculo esquelético en condiciones control fueron de  $0.054 (0.05, 0.05) \mu\text{M}$ , y después de la exposición a DEHP de  $0.066 (0.05, 0.06) \mu\text{M}$  ( $p= 0.128$ ). Las concentraciones de ácido úrico en células de músculo esquelético en condiciones control fueron de  $0.04 (0.03, 0.03) \mu\text{M}$  y después de la exposición a DEHP de  $0.08 (0.03, 0.06) \mu\text{M}$  ( $p= 0.156$ ). Las concentraciones de IMP en células de músculo esquelético en condiciones control fueron de  $0.20 (0.07, 0.26) \mu\text{M}$  y después de la exposición a DEHP de  $0.27 (0.15, 0.34) \mu\text{M}$  ( $p=0.141$ ). Las concentraciones de  $\text{NAD}^+$  en células de músculo esquelético fueron de  $0.40 (0.23, 0.40) \mu\text{M}$  bajo condiciones control y  $0.35 (0.28, 0.40) \mu\text{M}$  tras la exposición a DEHP ( $p= 0.143$ ). Las concentraciones de GDP en células de músculo esquelético fueron de  $0.22 (0.13, 0.32) \mu\text{M}$  bajo condiciones control y  $0.18 (0.10, 0.21) \mu\text{M}$  tras la exposición a DEHP ( $p= 0.447$ ). Las concentraciones de AMP en células de músculo esquelético fueron de  $0.17 (0.03, 0.22) \mu\text{M}$  bajo condiciones control y  $0.26 (0.02, 0.53) \mu\text{M}$  tras la exposición a DEHP ( $p= 0.062$ ).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Músculo como muestra de estudio

En el presente estudio, se analizaron las concentraciones de los metabolitos de purinas en cultivos celulares de músculo esquelético de humanos bajo condiciones control y después de la exposición a DEHP (1 mM) por 13 días. Las purinas contribuyen a las funciones celulares de los tejidos, entre ellos el músculo. Durante la ruta metabólica de las purinas, la mayor parte del ATP en músculo esquelético se genera por la vía de reciclado de purinas a través del IMP (Moriwaki *et al.*, 1999). EL IMP intramuscular se sintetiza mediante la vía de reciclaje, en la que la HX muscular se metaboliza a IMP por medio de la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) (Zieliński y Kusy, 2015). En el músculo esquelético las reservas intracelulares de ATP se agotan rápidamente durante eventos como isquemia e hipoxia, y su metabolismo resulta en la liberación de nucleósidos de purina a la circulación sistémica (Fisher *et al.*, 2019). Dada esta relación y su rápido crecimiento *in vitro*, utilizar células musculares para la medición de purinas bajo condiciones experimentales es una opción acertada.

### 8.2 Relación entre purinas y DEHP

Existen patologías que se agravan en presencia de ftalatos; por ejemplo, la estenosis pieloureteral (estrechez en el conducto que va del riñón a la vejiga) (Giordano, 2010), hipospadias (abertura de la uretra) (Choi, 2012), isquemia e infartos (Carran y Shaw, 2012). En individuos sometidos a endarterectomía carotídea e individuos que acudieron al hospital por accidente cerebrovascular y/o ataque isquémico transitorio se ha confirmado una liberación de altas concentraciones de purinas en el cerebro (Benjamin *et al.*, 2017). El aumento de nucleósidos de purinas también se ha confirmado en individuos con angina de pecho, infarto del miocardio, hipoxia sistémica, e individuos con enfermedad arterial periférica (Pío *et al.*, 2009; Roldán-Atienza, 2020). La correlación entre la incidencia de procesos patológicos en presencia de ftalatos y la liberación de purinas en los mismos casos clínicos podría tomarse como indicador de la relación fisiológica que tienen los metabolitos de las purinas y los ftalatos.

Liu *et al.* (2015) analizaron extractos de suero, orina y riñón de ratas con nefropatía diabética inducida por disruptores endocrinos. Los autores revelaron una diferencia significativa en los perfiles metabólicos entre las ratas bajo condiciones control y aquellas con nefropatía diabética, e identificaron varios metabolitos relacionados con la enfermedad; entre ellos, el ácido úrico, lo que sugiere que el metabolismo alterado de las purinas a causa de disruptores endócrinos, como los ftalatos, puede estar involucrado en la diabetes neófito (Liu *et al.* 2015).

Ambruosi *et al.* (2011) analizaron los efectos de la exposición aguda *in vitro* al DEHP sobre la maduración de los ovocitos, la energía y el estado oxidativo en el caballo, como un modelo de grandes especies. Los autores también evaluaron procesos de apoptosis de células cúmulos (CC), el estado oxidativo y la configuración de la cromatina nuclear en los ovocitos. Concluyeron que la exposición aguda *in vitro* al DEHP inhibe la maduración de los ovocitos equinos sin alterar la energía ooplasmática y los parámetros de estrés oxidativo en los ovocitos maduros que retienen el potencial para ser fertilizados y convertirse en embriones, aunque se necesitan más estudios para confirmar esta posibilidad (Ambruosi *et al.* 2011).

Papaioannou *et al.* (2021) realizaron un análisis multiómico para revelar los genes, proteínas y metabolitos afectados por la exposición a ftalatos y metales pesados. Los autores reportaron que la coexposición a ftalatos y metales perturba los procesos bioquímicos relacionados con la respiración mitocondrial durante las etapas críticas del desarrollo, con vínculos clínicos a perturbaciones del sistema nervioso. Los autores describen afectación en el ciclo de urea por colina fosfato citidililtransferasa, un nutriente esencial, que participa en la síntesis de purinas y es imprescindible para la estructura y la señalización celular, el transporte de lípidos, la neurotransmisión y el metabolismo monocarbonado (Fernández-Roig, 2012).

### **8.3 Purinas en respuesta a la exposición a DEHP**

En el presente estudio, las concentraciones de HX, adenosina, ADP, inosina y ATP disminuyeron tras exposición a DEHP (1 mM, 13 días); las concentraciones de AMP y GTP fueron mayores en presencia de este ftalato, y no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de X, ácido úrico, IMP, NAD<sup>+</sup> y GDP entre tratamientos. Estos resultados sugieren que en células

musculares expuestas a DEHP la capacidad de reciclado y síntesis de purinas disminuye y que, por lo tanto, prevalece la ruta de degradación de purinas, disminuyendo los niveles de ATP en respuesta a la exposición a ftalatos.

En el músculo, HX, adenosina, ADP y ATP participan en la activación de la vía extrínseca de apoptosis, como mediadores de la respuesta inflamatoria y en la reorganización tisular durante los cambios que ocurren en las fibras musculares (Wiendl *et al.*, 2005; Dragu *et al.*, 2011). La disminución de la concentración de estos metabolitos observada en presencia de DEHP en el presente estudio sugiere que podrían presentarse problemas inflamatorios y de apoptosis cuando el músculo se encuentre expuesto a este ftalato.

La adenosina desempeña un papel en la homeostasis; a nivel del músculo se manifiesta por un aumento en la liberación de adenosina que protege al tejido de una excesiva carga mecánica a través de disminuir la contracción y dar lugar, simultáneamente, a la vasodilatación, con lo que aumenta el aporte de oxígeno en músculo (Contreras, 1999). En el presente estudio, la concentración de adenosina disminuyó en presencia de DEHP, lo que podría sugerir un aumento de la contracción y potencial disminución de la vasodilatación en presencia de este contaminante.

Todas las células sometidas a actividad física deben mantener un balance entre la producción y la utilización del ATP. Durante la actividad física el músculo esquelético utiliza aproximadamente  $3.3 \times 10 \text{ mol gr}^{-1}$  de ATP, por lo que es indispensable su regeneración con rapidez (Volkov, 1998; López y Hernández, 2001; Acosta *et al.*, 2009). En el presente estudio, la concentración promedio de ATP disminuyó en presencia de DEHP, lo que podría sugerir una disminución de la energía disponible en el músculo esquelético, incluso en reposo, en presencia de este contaminante.

Estudios previos sugieren una relación del DEHP con los ácidos nucleicos y sus metabolitos (Huen *et al.*, 2016; Solomon *et al.*, 2017; Tíndula *et al.*, 2018). La correlación entre las concentraciones de nucleótidos y nucleósidos en el plasma, suero y orina de ratas que fueron

expuestas a  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DEHP por 10 días sugiere que los ftalatos pueden influir en las vías de degradación, recuperación y eliminación del metabolismo de los ácidos nucleicos (Liu *et al.*, 2015; Sureda *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018). En el mismo estudio, la disminución de las concentraciones de HX y X sugieren la activación de la vía de degradación de las purinas por la xantina oxidasa, que también produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), una potencial fuente de estrés oxidativo (Liu *et al.*, 2015; Sureda *et al.*, 2016). En el presente estudio, las concentraciones de HX en células musculares de humano en cultivo primario expuestas a DEHP fueron significativamente menores que en las células que se mantuvieron bajo condiciones control; es posible que esto sea causado por una mayor participación de las vías de degradación de nucleótidos en presencia de DEHP.

Bavaresco *et al.* (2005) sugieren que la HX podría ser la causa de la disfunción neuronal de los individuos afectados por el síndrome de Lesch-Nyhan. El síndrome de Lesch-Nyhan (SLN; OMIM: 300322) es una alteración congénita del metabolismo de las purinas debida a la deficiencia de la actividad de la enzima HGPRT. Neurológicamente, estos individuos presentan contracciones involuntarias permanentes de los músculos (distonía), movimientos incontrolables de brazos y piernas (coreoatetosis), retraso mental de medio a moderado y, en la mayoría de ellos, una conducta que provoca automutilaciones (Lesch y Nyhan, 1964). Además, la disminución de HX se asocia con altos niveles de ácido úrico y enfermedades como la gota (Ayala *et al.*, 2013). Por lo anterior, y dado el aumento de ácido úrico en células musculares expuestas a DEHP bajo condiciones de cultivo observado en el presente estudio, será recomendable investigar si una exposición crónica a este ftalato lleva a una acumulación generalizada de ácido úrico *in vivo* con las posibles implicaciones patológicas asociadas a la gota.

Las concentraciones de AMP y GTP en el presente estudio fueron mayores en células expuestas a DEHP en comparación con aquellas mantenidas bajo condiciones control. GTP y AMP participan en el estrés hemodinámico (cambios en el patrón del flujo sanguíneo) inducido por ejercicio agudo. AMP funciona también como precursor del AMP cíclico (AMPc), un nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos, entre ellos la vasodilatación (Rueda, 2012; García-Morales, 2014). El GTP se transforma en GMP cíclico (GMPc), lo que conlleva a la relajación del músculo a partir de un proceso de

mecanotransducción (Kim *et al.*, 2014; Rodríguez-Núñez, 2016). Un aumento desmedido de GTP produce, a su vez, una acumulación de GMPc en músculo (Moncada y Higgs, 1993; Murad, 2006). Esto activa las vías de señalización intracelulares que aumentan la contracción del músculo liso vascular, evitando al relajamiento del músculo (Silva *et al.*, 2011). En el presente estudio, la concentración promedio de GTP aumentó en presencia de DEHP, lo que potencialmente se reflejaría como un aumento de contracción en músculo en presencia de este contaminante.

La vida media de una purina puede aumentar cuando la tasa de degradación disminuye, y su estabilidad puede acelerarse debido a modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación o glicosilación de las enzimas implicadas en su metabolismo. Además, puede ser vinculada a un aglutinante de proteínas de vida larga que con el tiempo se acumula, mientras que la regeneración del ARNm es 25% más rápida que lo normal (Herrera-Cogco, 2020). Diversos autores mencionan que aún son necesarias investigaciones adicionales para establecer si las alteraciones de los metabolitos de los ácidos nucleicos reflejan un mejor mecanismo de reparación del ADN para combatir las lesiones, como inflamación y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, inducidas por ftalatos (Zhou *et al.*, 2018; Chong *et al.*, 2020).

En el presente estudio, las concentraciones de X, ácido úrico, IMP,  $\text{NAD}^+$  y GDP no mostraron una diferencia significativa entre tratamientos. La causa puede ser similar a lo que ocurre en el caso del estradiol en presencia de DEHP. El estradiol es una hormona esteroide presente principalmente en mujeres, la cual puede inducir errores cromosómicos y mutaciones de purina derivadas de la oxidación, ya que las quinonas intermedias derivadas de la oxidación del 4-hidroxiestradiol o 4-hidroxiestronea pueden reaccionar con las purinas (adenina y guanina) del ADN para formar sitios mutagénicos. (Cavaliere *et al.*, 2000). Algunos estudios sobre la producción de estradiol muestran que la concentración de esta hormona no es afectada por MEHP en humanos, pero sí su expresión. Esto sugiere que el efecto de este ftalato en la expresión de hormonas involucrado en la síntesis de estradiol no se refleja en su nivel de proteína y, por lo tanto, su producción no se ve afectada (Cavaliere *et al.*, 2000; y Reinsberg *et al.*, 2009). De manera similar, es posible que la exposición a DEHP afecte la expresión pero no actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de X, ácido úrico, IMP,  $\text{NAD}^+$  y GDP y,



por lo tanto, la concentración de estas purinas no cambia después de la exposición al DEHP, como se observó en el presente estudio.

Sicińska *et al.* (2021) evaluaron el riesgo genotóxico y el daño al ADN inducido por ftalatos y sus metabolitos en sangre y músculo de humano. Observaron un aumento significativo del nivel de ERO (incluyendo HO<sup>•</sup>) que fue inducido por ftalatos, causando daño oxidativo a las purinas. Las sustancias estudiadas no formaron aductos con el ADN. Sin embargo, las células en sangre y músculo expuestas a ftalatos y sus metabolitos mostraron un alta (88%) eficiencia de reparación del ADN.

#### **8.4 Consecuencias ambientales**

El ambiente recibe una variedad de contaminantes que causan estrés oxidativo; las respuestas de los organismos expuestos a estos contaminantes pueden servir como biomarcadores de contaminación (Rodríguez-Ortega, 2003). Los enfoques proteómicos, por ejemplo, son estudios de las modificaciones postraduccionales de proteínas que a menudo juegan un papel fundamental en la regulación de su actividad, como la síntesis de purinas y glutatión, con consecuencias en el metabolismo y la salud del organismo (Magnusson *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2004). Estos métodos prueban nuevos biomarcadores mediante la identificación de proteínas cuya expresión es alterada por la exposición a contaminantes, incluso cuando no se conoce su función (Dowling y Sheehan, 2006).

Diversos estudios han identificado nuevos biomarcadores de contaminación a través de enfoques proteómicos. La hipoxantina, xantina, fosforibosil transferasa, y gliceraldehído-3-P deshidrogenasa poseen características útiles para ser utilizadas como biomarcadores de contaminación ambiental, ya que permiten la evaluación de la respuesta biológica temprana (da Silva *et al.*, 2000; Neri *et al.*, 2005; Zabala *et al.*, 2005; Kuzmick *et al.*, 2007). En el presente estudio, la concentración de HX es significativamente menor en células musculares de humano en cultivo primario expuestas a DEHP (1 mM, 13 días) en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control. Se sugiere que la concentración de HX podría utilizarse para evaluar e identificar la presencia de DEHP y los efectos que este contaminante genera en músculo de humanos *in vivo*.

## 9. CONCLUSIONES

Los metabolitos que mantuvieron una mayor concentración en las células de músculo esquelético mantenidas bajo condiciones control que en las células expuestas a DEHP fueron HX, inosina, adenosina, GTP, ADP y ATP. La disminución de la concentración de estos metabolitos en presencia de DEHP indica que podrían presentarse problemas inflamatorios y de apoptosis cuando el músculo se encuentre expuesto a este ftalato. Los metabolitos que no presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos fueron X, ácido úrico, IMP,  $\text{NAD}^+$ , GDP y AMP. Esto puede sugerir que el efecto de este ftalato en la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de estos metabolitos no se refleja en su actividad y, por lo tanto, la concentración de dichos metabolitos no se ve afectada. En el presente estudio, la concentración promedio de GTP en células de músculo esquelético aumentó en presencia de DEHP, lo que podría sugerir una pérdida de relajación en músculo en presencia de este contaminante. Estos análisis sobre la respuesta a la exposición a DEHP en células de músculo esquelético de humano en condiciones de cultivo celular ayuda a sentar bases para proponer herramientas de diagnóstico y tratamiento para las afecciones asociadas a la exposición a ftalatos. Además, la correlación entre la incidencia de procesos patológicos en presencia de ftalatos y la liberación de purinas en los mismos casos clínicos podría tomarse como indicador de la relación fisiopatológica que tienen los metabolitos de las purinas y los ftalatos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ambrosi, B., Filioli Uranio, M., Sardanelli, A. M., Pocar, P., Martino, N. A., Paternoster, M. S., Dell'Aquila, M. E. (2011). In Vitro Acute Exposure to DEHP Affects Oocyte Meiotic Maturation, Energy and Oxidative Stress Parameters in a Large Animal Model. *ONE*, 6(11), e27452. doi:10.1371/journal.pone.0027452
- Ayala-García, M.A., Ramírez-Barba, E.J., Quiroz-Guerrero, J.J., Ortiz-Martínez, J.J., y González-Yebra, B. (2013). Papel del alopurinol en las adherencias peritoneales al colocar una malla de polipropileno: Estudio experimental en ratas. *Cirujano general*, 35(1) Pp 16-19.
- Badia-Tahull, M.B., Leiva-Badosa, E., Colls-González, M., y Talaverón J. (2018). Disruptores endocrinos en nutrición artificial. *Nutr Hosp*, Vol 35, Pp 469-473
- Barr, D.B., Del Silva, N.A., y De Katok, M. (2003). Determinación de la exposición humana a los ftalatos y sus metabolitos. *Revista de contaminación ambiental*. Vol 23. Pp 43-48
- Bavaresco, C.S., Chiarani, F., Matté, C., Wajner, M., Netto, C., y De Souza, W. (2005). Effect of hypoxanthine on Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> -ATPase activity and some parameters of oxidative stress in rat striatum. *Brain Res*. Vol 1041, Pp 198-204.
- Benjamin, S., Masai, E., Kamimura, N., Takahashi, K., Anderson, R. C., y Faisal, P. A. (2017). Phthalates impact human health: epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of hazardous materials*. Vo 340, Pp 360-383.
- Bornaz Acosta, G., y Bornás Acosta, S. (2019). Xenobióticos. *Revista Ciencia Y Desarrollo*. Vol. 6, Pp 27-33.
- Brandan N.C., y Aispuru G. (2003). Metabolismo de compuestos hidrogenados. Disponible en: <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/nitro.pdf>.
- Burns C.M., y Wortmann R.L. (2019). Capítulo 431e: Trastornos del metabolismo de las purinas y pirimidinas. En Kasper D, y Fauci A, y Hauser S, y Longo D, y Jameson J, y Loscalzo J(Eds.), *Trastornos del metabolismo de las purinas y pirimidinas. Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e. McGraw Hill*. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1717ysectionid=1149408>
- Bustamante-Montes, P., Lizama-Soberanis, B., Olaíz-Fernández, G. y Vázquez-Moreno, F. (2013). Ftalatos y efectos en la salud. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17 (4) Pp 205-215
- Carran, M. y Shaw, I. C. (2012). New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate is associated with an increased incidence of cryptorchidism, hypospadias, and breast cancer in their children. *The New Zealand medical journal*, 125(1358), Pp 52-63.
- Carlstedt F, Jönsson, B.A. y Bornehag, C.G. (2013). PVC flooring is related to human uptake of phthalates in infants. *Indoor Air*. 23(1) Pp 32-9
- Casals-Casas C. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol*. 73(1). Pp 135-62

- Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., y Roy, D. (2000). Chapter 4: Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents-DNA Adducts and Mutations. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, Vol 27, Pp 75-93.
- Chen, G.R., Dong, L., y Ge, R.S. (2007). Relationship between phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 13(3) Pp 195-200
- Chichizola, C., Scaglia, H., Franconi, C., Ludueña, B., Mastandrea, C., Y Ghione-Pelayo, A. (2009). Disruptores endócrinos y el sistema reproductivo. *Bioquímica y Patología Clínica de Argentina*. 73(3) Pp 9-25
- Choi, H. (2012). The association between some endocrine disruptors and hypospadias in biological samples. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances y environmental engineering*, 47(13), Pp. 2173-2179.
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., y Bourque, G. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*. Vol 46, Pp 86-94. doi: 10.1093/nar/gky310
- Contreras, E. (1999). Adenosina: acciones fisiológicas y farmacológicas. *Arch Biol Med Exp (Santiago)*, 23(1), Pp 1-12.
- Contreras Roura, J. (2012). Errores innatos del metabolismo de las purinas y otras enfermedades relacionadas. *Revista Cubana de Pediatría*, 84(2), Pp 197-200.
- Da Silva, J., de Freitas, T.R., Heuser, V., Marinho, J.R., Bittencourt, F., Cerski, C.T., Kliemann, L.M., y Erdtmann, B. (2000). Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomystorquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutat*. 470: Pp 39-51.
- Dalsenter, P. R., Santana, G.M., Grande, S.W. y Andrade, A.J. (2006). Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats, *Hum. Exp. Toxicol*. 25: Pp 297-303
- Dragu A., Schnürer S., Surmann-Schmitt C., von der Mark K., Stürzl M., y Unglaub F. (2011). Gene expression analysis of ischaemia and reperfusion in human microsurgical free muscle tissue transfer. *J Cell Mol Med*. 15(4) Pp 983-93.
- Dowling, V. A., y Sheehan, D. (2006). Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics*, 6(20). Pp 5597-5604.
- Duty S.M., Ackerman, R.M. y Calafat, A.M. (2005). Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters. *Environ Health Perspect*. 113(11) Pp 1530-1535
- Factor-Litvak P., Insel, V., Calafat, A., Liu, X., Perera, F., Rauh, V.A., y Whyatt, R.M. (2014). Persisten Associations between maternal Prenatal Exposure to Phthalates on Child IQ at age 7 years. Pp 1-15.
- FDA (USA). (2001). Safety assessment of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from PVC medical devices. Center for Devices and Radiological Health. U.S. Food and Drug Administration

- Ferguson K.K., Cantonwine, D.E., y Rivera-González, L.O. (2014). Urinary phthalate metabolite associations with biomarkers of inflammation and oxidative stress across pregnancy in Puerto Rico. *Environ Sci Technol*, 48(12) Pp 7018-7025
- Fernández-Roig, S. (2012). Contribución de la colina y la betaína al metabolismo de la homocisteína durante la gestación. Universidad Rovira I Virgili, Tarragona, España. Repositorio: 1431-2012.
- Fisher, O., Benson, R. A., y Imray, C. H. (2019). The clinical application of purine nucleosides as biomarkers of tissue Ischemia and hypoxia in humans in vivo. *Biomarkers in Medicine*. doi:10.2217/bmm-2019-0049
- Foster, P. M., Cattley, R.C. y Mylchreest, E. (2000). Effects of di-nbutyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: Implications for human risk assessment. *Food Chem.Toxicol*. Vol 38 Pp 97-99
- Foster, P.M. (2006). Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl*, 29(1), Pp 140-7. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005. 00563.x
- Ghaemi-Oskouie, F., y Shi, Y. (2011). The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Clin Rheumatol Rep*. Vol 13 Pp 160-6.
- Giannattasio, S. (2003). Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and beta-nicotinamide adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. *Brain Research Protocols*, 10(3), Pp.168-174.
- Giordano, F. (2010). Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. Wiley Blackwell, 88(4).
- Glantzounis, G. E. Tsimoyiannis, A. Kappas, y Galaris, D. (2005). Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des*. 11:414551.
- Gobierno Francés. Mandato: Publication of Law no. 2015-1442 for the Suspension of the manufacture, import, export and marketing of all-purpose packaging containing bisphenol A and others. France: J Off la Repub Fr (Official J French Republic). Recuperado el 12 de Abril de 2020 de: [http://www.bureauveritas.com/1f11efcfacb44b1e92b7c33d4a56f02e/Bulletin\\_13B-101.pdf?](http://www.bureauveritas.com/1f11efcfacb44b1e92b7c33d4a56f02e/Bulletin_13B-101.pdf?)
- Gómez-Ruiz, F. (1989). Metabolismo de las bases nitrogenadas en la obesidad inducida por dieta de cafetería. Universidad de Valencia. 88 p.
- Gonzalo-Claros, J. (2010). Biorom 2010: Apuntes de Metabolismo de ácidos nucleicos, nucleótidos y bases nitrogenadas. Recuperado el 12 de diciembre de 2020 de: [https://www.sebbm.es/BioROM/contenido/av\\_bma/apuntes/T2/ruta\\_novo.html](https://www.sebbm.es/BioROM/contenido/av_bma/apuntes/T2/ruta_novo.html)
- Grande, S.W., Andrade, A.J., Talsness, C.E. y Grote, K. (2006). A dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate: Effects on female rat reproductive development, *Toxicol. Sci*. Vol 91, Pp 247-254.

- Gray L. E., Ostby, J., Furr, J. y Price, M. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* Vol 58, Pp 350-365.
- Guyton, A.; Hall, J. (1991). Tratado de Fisiología Médica, 8ª Edición. Madrid: Editorial Interamericana Mc Graw Hill.
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* Vol 33, Pp 777-797.
- Hauser, R., Meeker, J. D., Singh, N. P., Silva, M. J., Ryan, L., Duty, S., y Calafat, A. M. (2007). DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Human Reproduction*, 22(3), Pp 688-695.
- Hauser R. (2008). Urinary phthalate metabolites and semen quality: a review of a potential biomarker of susceptibility. *Int J Androl.* 31(2) Pp 112-117.
- Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Mächtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., vom Saal, F. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology*, Vol 68, Pp 3-33. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.10.001
- Herrera-Cogco, E. C. (2020). Efecto de los parabenos sobre la esteroidogénesis en un cultivo primario de células de la granulosa humana. CINESTAV. Para grado de Maestría. 69 p.
- Herr, C., zur Nieden, A., Koch, H.M., Schuppe, H.C., Fieber, C., Angerer, J., Eikmann, T. y Stilianakis, N.I. (2009). Urinary di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)—metabolites and male human markers of reproductive function. *International journal of hygiene and environmental health*, 212(6), Pp 648-653.
- Heudorf U., Mersch-Sundermann, V., y Angerer, J. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*, 210(5), Pp 623-634.
- Huen, K., Calafat, A.M., Bradman, A., Yousefi, P., Eskenazi, B., y Holland, N. (2016) Maternal phthalate exposure during pregnancy is associated with DNA methylation of LINE-1 and Alu repetitive elements in Mexican-American children. *Environ Res.* Vol 148, Pp 55-62. doi: 10.1016/j.envres.2016.03.025
- Ishihara, M., Itoh, M., Miyamoto, K., Suna, S., Takeuchi, Y., Takenaka, I., y Jitsunari, F. (2000). Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *International Journal of Andrology*, 23(2), Pp 85-94. doi:10.1046/j.1365-2605.2000. 00212.x
- Jacobson, M.S., Kevy, S.V., y Grand, R.J. (1977). Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on the subhuman primate: a consequence of chronic transfusion therapy. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 89(5), Pp 1066-1079.
- Jurecka, A. (2009). Inborn error of purine and pyrimidine metabolism. *Inherit Metab Dis.* Vol 32, Pp 247-263
- Kambia N., Dine, T., y Gressier B. (2011). Correlation between exposure to phthalates and concentrations of malondialdehyde in infants and children undergoing cyclic parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 35(3) Pp 395-401

- Kim, B., Lee, H., Kawata, K., y Park, J.Y. (2014). Exercise-Mediated Wall Shear Stress Increases Mitochondrial Biogenesis in Vascular Endothelium. *PLoS ONE*, 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0111409
- King, M.W. (2015). Biosíntesis, regulación y catabolismo de purinas. Recuperado el 11 de abril del 2020 de: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/nucleotide-metabolism-sp.php>.
- Kolarik B., Naydenov, K. y Larsson, L. (2008). The association between phthalates in dust and allergic diseases among Bulgarian children. *Environ Health Perspect*; 116(1), Pp 98-103.
- Kuzmick, D.M., Mitchelmore, C.L., Hopkins, W.A., y Rowe, C.L. (2007). Effects of coal combustion residues on survival, antioxidant potential, and genotoxicity resulting from full lifecycle exposure of grass shrimp (*Palaemonetes pugio* Holthius). *Sci. Total, Environ.* Vol 373, Pp 420-430.
- Lesch M., y Nyhan W.L., (1964). A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am J Med*, 36, Pp 561-570.
- Lindholm, P., Lundgren, C.E. (2009). The physiology and pathophysiology of human breath-hold diving. *J Apply Physiol.* 106: Pp 284-292.
- Liu, J., Wang, C., Liu, F., Lu, Y., y Cheng, J. (2015). Metabonomics revealed xanthine oxidase-induced oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Anal Bioanal Chem.* 407 Pp 2569-2579. doi: 10.1007/s00216-015-8481-0
- Loff P., Subotic, U. y Oulmi-Kagermann, J. (2007). Diethylhexylphthalate extracted by typical newborn lipid emulsions from polyvinylchloride infusion systems causes significant changes in histology of rabbit liver. *J Parenter Enteral Nutr*, 31(3), Pp 188-193.
- López, Ch., y Hernández, A. (2001). Fisiología del Ejercicio. 2da Edición. Madrid. *Editorial Médica Panamericana*.
- López-Espinosa, M.J. (2007). Exposición materno infantil vía placentaria a compuestos químicos con actividad hormonal. *Anuales españoles de pediatría* vol. 56. Pp 345-352.
- Lu, Z., Zhang, C., Han, C., An, Q., Cheng, Y., Chen, Y., y Su, J. (2019). Plasticizer bis(2-ethylhexyl) phthalate causes meiosis defects and decreases fertilization ability of mouse oocytes in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00121
- Luo, H., Sun, G., Shi, Y. (2014). Evaluation of the Di(2-ethylhexyl) phthalate released from polyvinyl chloride medical devices that contact blood. *Springer Plus* 3, Vol 58. Doi: 10.1186/2193-1801-3-58
- Magliozzi R., Nardacci, R. y Scarsella, G. (2003). Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem Cell Biol*, 120(1), Pp 41-49.
- Main, K.M., Mortensen, G.K., y Kaleva, M.M. (2006). Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect.* 114(2). Pp 270-276.
- Mallow, E.B., y Fox, M.A. (2014). Phthalates and critically ill neonates: device-related exposures and non-endocrine toxic risks. *J Perinatol*, 34(12), Pp 892-897.

- Magnusson, L.U., Nystrom, T., Farewell, L. (2003). Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approaches. *J Biol Chem*, 278, Pp 968-973.
- Meeker, J.D., Calafat, A.M. y Hauser, R. (2009). Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *J Androl.*30(3) Pp 287-297.
- Mendiola, J., Jørgensen, N., Andersson, M.A. (2011). Associations between urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormones in fertile men. *Int J Androl.* 34(4) Pp 369-78.
- Mendiola, J., Meeker, J.D. y Jørgensen, N. (2012). Urinary concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites and serum reproductive hormones: pooled analysis of fertile and infertile men. *J Androl.* 33(3) Pp 488-498.
- Mo, N., Zhang, M., Wang, R., Xia, S., Meng, F., Qian, Y., y Li, M. (2019). Effects of  $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE2) and diethylhexyl phthalate (DEHP) on growth performance, antioxidant status and immune response of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.108615
- Moncada, S., Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329 (27) Pp 2002-2012
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Higashino, K. (1999). Enzymes involved in purine metabolism--a review of histochemical localization and functional implications. *Histol Histopathol.* doi: 10.14670/HH-14.1321
- Murad, F. (2006). Nitric Oxide and Cyclic GMP in Cell Signaling and Drug Development. *New England Journal of Medicine*, 355(19) Pp 2003-2011. doi:10.1056/nejmsa063904
- Mylchreest, E. y Foster, P.M.D. (1998). Antiandrogenic effects of di(n-Butyl) phthalate on male reproductive development: A nonreceptor-mediated mechanism. *CIIT*. Vol 18, Pp 1-10.
- National toxicology program. (1995). Toxicity studies of dibuthiphthalate. National toxicology program report series. Cas 84-72-2.
- Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L.E., Srám, R.J., Ceppi, M., Bocchini, V., Merlo, D.F. (2006). Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of comprehensive literature search and metaanalysis. *Mutat.Res.* 612 Pp 14-39.
- Olsson, B., Bradley, B. P., Gilek, M., Reimer, O., Shepard, J. L., y Tedengren, M. (2004). Physiological and proteomic responses in *Mytilus edulis* exposed to PCBs and PAHs extracted from Baltic Sea sediments. In *Biology of the Baltic Sea* (pp. 15-27). Springer, Dordrecht.
- Ortega-García, A., Tortajada, F., Molini-Mechón, N., López-Andreu, A., García, I., Castel, J., y Cánovas, C. (2002). Hospital sostenible parte I: exposición pediátrica a policloruro de vinilo y ftalatos. *Revista española de pediatría*. Vol. 58. Pp 251-266.
- Papaioannou, N., Distel, E., de Oliveira, E., Gabriel, C., Frydas, I. S., Anesti, O., Sarigiannis, D. A. (2020). Multi-omics analysis reveals that co-exposure to phthalates and metals disturbs



- urea cycle and choline metabolism. *Environmental Research*. doi: 10.1016/j.envres.2020.110041
- Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambricht, C.R., y Abbott, B.D. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat, *Toxicol. Sci.*, Vol 58, Pp 339-349.
- Pedley, A. M., y Benkovic, S. J. (2017). A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(2), Pp 141-154. doi:10.1016
- Petersen, J.H., y Jensen, L.K. (2011). Phthalates and food-contact materials: enforcing the 2008 European Union plastics legislation. *Food Addit Control*, 27(11), Pp 1608-1616. doi: 10.1080/19440049.2010.501825.
- Pío-Asín, M., Segrelles-Bellmunt, G., Arrondo-Velasco, A., y Sarobe-Carricas, M. (2009). Infarto agudo de miocardio y pemetrexed. *Farmacia Hospitalaria*, 33(n02).
- Rajesh, P., Sathish, S., Srinivasan, C., Selvaraj, J., y Balasubramanian, K. (2013). Diethyl Hexyl Phthalate (DEHP) is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: Protective role of antioxidant vitamins (C y E). *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(3), 558–569. doi:10.1002/jcb.24399
- REACH: Regulación europea de sustancias químicas. (2017). Guía y fichas sobre datos de seguridad e exposición. Recuperado el 10 de abril del 2020 de [https://echa.europa.eu/documents/10162/22786913/sds\\_es\\_guide\\_es.pdf/e256e6b5-df54-087c-1eca-4580b0ed92d3](https://echa.europa.eu/documents/10162/22786913/sds_es_guide_es.pdf/e256e6b5-df54-087c-1eca-4580b0ed92d3)
- Reinsberg, J., Wegener-Topper, P., van der Ven, K., van der Ven, H., y Klingmueller, D. (2009). Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 239(1), Pp 116-123. doi: 10.1016/j.taap.2009.05.022
- Robinson, L., y Miller, R. (2016). The impact of bisphenol A and phthalates on allergy, asthma, and immune function: a review of latest findings. *Current environmental health reports*, 2(4), Pp 379-387.
- Rodríguez-Núñez, I., Romero, F., y Saavedra, M. J. (2016). Estrés hemodinámico inducido por ejercicio: bases fisiológicas e impacto clínico. *Archivos de cardiología de México*, 86(3), Pp 244-254.
- Rodwell, V.W. (2015). Metabolismo de nucleótidos en pirimidinas y purinas. En: Murray, R., D. Bender, K. Botham, P. Kenelly, y P. A. Weil (eds.) *Harper: Bioquímica Ilustrada. Editorial Mc Graw Hill*. 29ª edición. México, CDMX. Pp 331-342.
- Roldán Atienza, N. (2020). Seguridad cardiovascular en pacientes en tratamiento febuxostat.
- Royo-Bordonada, M.A. (2017). Nutrición en salud pública. Escuela Nacional de Sanidad. España. 356 p.
- Rueda, C. M., Velilla, P. A., Rojas, M., y Rugeles, M. T. (2012). AMPc: una molécula clave en los eventos de regulación inmune y en el control de la replicación del VIH. *Infectio*, 16(1), Pp 59-71.
- Rusyn, I., Peters, J. M., y Cunningham, M. L. (2006). Effects of DEHP in the Liver: Modes of Action and Species-Specific Differences. *Crit Rev Toxicol*. 36(5): Pp 459-479.

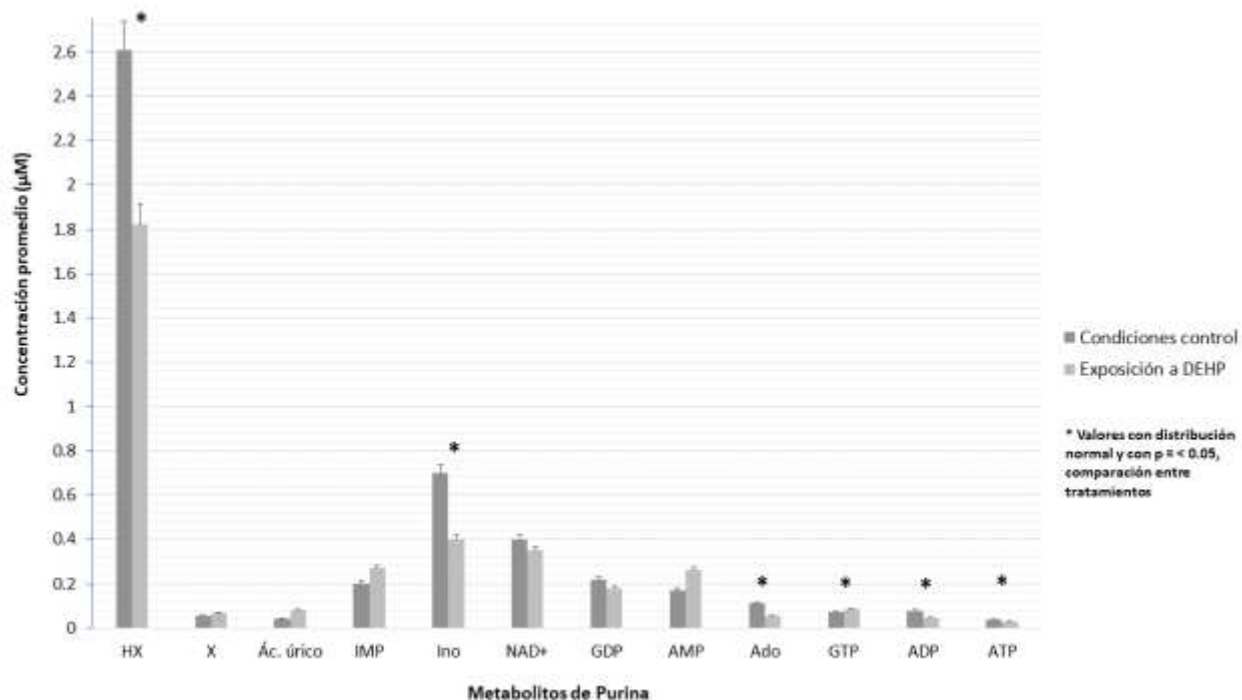
- Saidur R., Woo-Sung, K., June-Sub, L., Sung-Jae, Y., Buom-Yong, R. y Myung-Geol, P. (2015). Bisphenol-A affects Male Fertility via Fertility-related proteins in spermatozoa. *Scientific Reports*; 5: 9169.
- Sailas B., Masai, E., Kamimura, N., Takahashi, E., Anderson, C.E., y Faisal, P. (2017). Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of Hazardous Materials*. 40 (4): Pp 360-383. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.06.036
- Shen, G., Zhou, L., Liu, W., Cui, Y., Xie, W., Chen, H., Li, H. (2017). Di(2-ethylhexyl) phthalate Alters the Synthesis and  $\beta$ -Oxidation of Fatty Acids and Hinders ATP Supply in Mouse Testes via UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS-Based Metabonomics Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(24), Pp 5056-5063. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01015
- Shneider B., Cronin, L., y Van Marter, J. (1991). A prospective analysis of cholestasis in infants supported with extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 13(3), Pp 285-289.
- Sicińska, P., Mokra, K., y Wozniak, K. (2021). Genotoxic risk assessment and mechanism of DNA damage induced by phthalates and their metabolites in human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep* 11, 1658. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79932-5>
- Sikka S.C., y Wang, R. (2008). Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Andol*; 10(1) Pp 134-145.
- Silva, P. S., Lacchini, R., Gomes, V. de A., y Tanus-Santos, J. E. (2011). Implicaiones farmacogenéticas de polimorfismos da eNOS para drogas de daño cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 96(2), Pp 27-34. doi:10.1590/s0066-782x2011000200017
- Smith C.A., MacDonald, A., y Holahan, M.R. (2011). Acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate adversely impacts hippocampal development in the male rat. *Neuroscience*; 193 Pp 100-108.
- Solomon O., Yousefi P., Huen K., Gunier R.B., Escudero-Fung M., y Barcellos, L.F. (2017). Prenatal phthalate exposure and altered patterns of DNA methylation in cord blood. *Environ Mol Mutagen*. 58 Pp 398–410. doi: 10.1002/em.22095
- Stahlhut R.W., E. Van Wijngaarden, y T.D. Dye. (2007). Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect*, 115(6), Pp 876-882.
- Sureda A, Del Mar Bibiloni M, Martorell M, Buil-Cosiales P, Marti A, Pons A. (2016). Mediterranean diets supplemented with virgin olive oil and nuts enhance plasmatic antioxidant capabilities and decrease xanthine oxidase activity in people with metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res*. Vol 60, Pp 2654-2664. doi: 10.1002/mnfr.201600450
- Teitelbaum D.T. (2016). Introducción a la toxicología: ocupacional y ambiental. Katzung B.G., y Trevor A.J.(Eds.), Farmacología básica y clínica, 13e. McGraw Hill.
- Tindula G, Murphy SK, Grenier C, Huang Z, Huen K, Escudero-Fung M. (2018). DNA methylation of imprinted genes in Mexican American newborn children with prenatal phthalate exposure. *Epigenomics*, vol 10, Pp 1011–1026. doi: 10.2217/epi-2017-0178

- Toledo, A., Bermúdez, V., Elliuz, C., Mayela, A., Acosta, D., Luti, L., Rojas, Y., Velasco, E., y Finol, M. (2009). Actividad física y enfermedad cardiovascular. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, Vol. 4, núm.1, pp.2-17. ISSN: 1856-4550.
- Tsatsakis, A. M., I. Katsikantami, O. Kalantzi, C. Sevim, K. Tsarouhas, D. Sarigiannis, A.K. Rizos. (2018). Phthalates: Exposure and Health Effects. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.11434-4
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncola, M.T.D. Cronin, M. Mazura, y J. Telser. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39:44-84.
- Vanbergen, O. y G. Wintle. (2019). Purinas, pirimidinas, hemo y transferencia de carbono. En: Vanbergen, Wintle, P. Xiu, y M. Dominiczack (eds). *Curso Crash: Lo esencial en metabolismo y nutrición*. Editorial Elsevier. 5ta edición. España. Pp 128-133.
- Vázquez, M., R. Gutiérrez, J.J. Pérez, A. Escobar, J.G. Rivera y S. Vega. (2017). Presencia de ftalatos en agua embotellada comercializada en la ciudad de México y su migración durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 8(5), Pp 91-103.
- Valenzuela M, Alex. (2016). Uric acid: is it a new contributing factor to the development of obesity? *Revista chilena de nutrición*, 43(3), Pp 303-307.
- Volkov, N.; Menshikow, V. (1998). Bioquímica de la Actividad Física. Vneshtorgizdat, Moscú
- Von Rettberg H, T. Hannman, y U. Subotic. (2009). Use of di (2 ethylhexyl) phthalate containing infusion systems increases the risk for cholestasis. *Pediatrics*;124(2):710.
- Vorbach, C., R. Harrison, y M. Capecchi. (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol.*, 24, 512–517
- Wayne, D. (2010). Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud (4a. ed.). México: Limusa Wiley.
- Wang, Y., Wang, T., Ban, Y., Shen, C., Shen, Q., Chai, X., Wei, J. (2018). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Exposure Modulates Antioxidant Enzyme Activity and Gene Expression in Juvenile and Adult *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(1), 145-156. doi:10.1007/s00244-018-0535-9
- Wang, Y. Z. Hongkai y K. Kurunthachalam. (2019). A Review of biomonitoring of phthalate exposures. *Toxics* 2019, 7, 21; doi:10.3390/toxics7020021
- Whyatt R.M., M.S. Perzanowski, y A.C. Just. (2014). Asthma in inner-city children at 5-11 years of age and prenatal exposure to phthalates: The Columbia Center for Children's Environmental Health Cohort. *Environ Health Perspect.* 122(10), Pp 1141-1146.
- Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier BC. (2005) Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol.* 26(7) Pp 373-380.
- Zabala, G. S., Lezcano, R. A., y Marcos, F. V. (2005). Toxicología ambiental/ ecotoxicología. Efectos de los disruptores endocrinos sobre las vías de síntesis y de metabolismo de las hormonas sexuales en peces. R. Thibaut. *Rev. Toxicol*, 22, 128.
- Zar, J.H. (2009). Biostatistical analysis. 4<sup>th</sup> edi. Prentice-Hall. Upper Saddle River. N.J. 994

- Ze D., A. Pascarella, C. Barrese. (2009). DEHP effects on retinal vessels in newborn rats: a qualitative and quantitative analysis. *Histochem Cell Biol*;132(5) Pp 567-575.
- Zhao, Y., Li, M.-Z., Shen, Y., Li, J., Wang, H.-R., Talukder, M., y Li, J. (2020). Lycopene prevents DEHP-induced Leydig cell damage with the Nrf2 antioxidant signaling pathway in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06882
- Zhou M, Ford B, Lee D, Tindula G, Huen K, Tran V, Bradman A, Gunier R, Eskenazi B, Nomura DK y Holland N. (2018). Metabolomic Markers of Phthalate Exposure in Plasma and Urine of Pregnant Women. *Front Public Health* 6:298. doi: 10.3389/fpubh.2018.00298
- Zieliński, J., y Kusy, K. (2015). Pathways of purine metabolism: effects of exercise and training in competitive athletes.

## 11. ANEXOS

### ANEXO A. Concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de metabolitos de purinas



Concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de metabolitos de purinas en células de músculo esquelético de humano ( $n=5$  mujeres) en cultivo primario bajo condiciones control y expuestas a di(2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM, 13 días). Los resultados con distribución normal se presentan como medias  $\pm$  error estándar y aquellos con distribución no paramétrica se presentan como medianas y percentiles (25-75).  $*$  =  $p < 0.05$ . HX= hipoxantina, X= xantina, Ác. úrico = ácido úrico, IMP= inosina monofosfato, Ino = Inosina, NAD<sup>+</sup>= nicotinamida adenina dinucleótido, GDP= guanosín difosfato, AMP= adenosina monofosfato, Ado= adenosina, GTP= guanina trifosfato, ADP= adenosín difosfato, ATP= adenosina trifosfato.