



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN  
LEUCOCITOS DE MAMÍFEROS MARINOS  
Y TERRESTRES EN RESPUESTA A RETOS  
PROINFLAMATORIOS.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Taryn Elizabeth Symon**

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2020.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 20 del Mes de Octubre del 2020, 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:

### “INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LEUCOCITOS DE MAMÍFEROS MARINOS Y TERRESTRES EN RESPUESTA A RETOS PROINFLAMATORIOS”

Presentada por el alumno:

**Taryn Elizabeth Symon**

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.



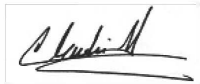
LA COMISIÓN REVISORA



---

Dra. Tania Zenteno Savín  
Directora de Tesis

Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Co-Tutor



---

Dra. Claudia J. Hernández Camacho  
Co-Tutora



---

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

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

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

Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor

Dra. Claudia J. Hernández Camacho  
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marina, Instituto Politécnico Nacional  
Co-Tutora

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Tania Zenteno Savín  
Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Dra. Claudia J. Hernández Camacho

### **Jurado de Examen**

Dra. Tania Zenteno Savín  
Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Dra. Claudia J. Hernández Camacho

### **Suplente**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

## Resumen

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes y puede ocurrir durante la inflamación y los ciclos de isquemia y reperfusión. Los antioxidantes reducen el riesgo de daño oxidativo. Los mamíferos marinos experimentan ciclos de isquemia tisular y reperfusión como parte de la respuesta al buceo. Los procesos proinflamatorios se inician mediante el reclutamiento de leucocitos para destruir patógenos y tejidos dañados. Nuestra hipótesis es que la mayor defensa antioxidante reportada para los tejidos de los mamíferos marinos proporciona una protección adicional en situaciones que producen estrés oxidativo, como inflamación, en comparación con los tejidos de los mamíferos terrestres. En este trabajo se aislaron leucocitos de tursiones, *Tursiops truncatus gilli*, y humanos, *Homo sapiens*, y se expusieron a lipopolisacáridos (LPS), *in vitro*, para imitar un desafío proinflamatorio. Se cuantificaron los indicadores de estrés oxidativo mediante espectrofotometría. Después de 48 h de exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron una producción de radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) significativamente mayor, defensas antioxidantes generalmente más altas y concentraciones de carbonilos proteicos significativamente más bajas en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Estos resultados sugieren que, en condiciones de cultivo celular, las defensas antioxidantes de los leucocitos de *T. truncatus gilli* proporcionan una protección adicional contra los retos proinflamatorios en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. La mayor respuesta a LPS en los leucocitos de *T. truncatus gilli* en comparación con los leucocitos de *H. sapiens* es probablemente una ventaja adaptativa resultante de un estilo de vida totalmente acuático. En los leucocitos de *T. truncatus gilli*, el sexo y el estadio de madurez aparentemente no influyeron en los indicadores de estrés oxidativo tras una respuesta proinflamatoria.

**Palabras clave:** Defensa antioxidante, especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo, leucocito, mamífero marino

Número ORCID - 0000-0003-2917-4525



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

## Summary

Oxidative stress is the disequilibrium between oxidants and antioxidants and can occur during inflammation and cycles of ischemia and reperfusion. The risk of oxidative damage is reduced by antioxidants. Marine mammals undergo cycles of tissue ischemia and reperfusion as part of the dive response. Proinflammatory processes are initiated by the recruitment of leukocytes to destroy pathogens and damaged tissues. Our hypothesis is that the increased antioxidant defense reported for marine mammal tissues provides additional protection in situations that produce oxidative stress, like inflammation, in comparison to the tissues of terrestrial mammals. In this study, leukocytes from bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus gilli*, and humans, *Homo sapiens*, were isolated and exposed to lipopolysaccharides (LPS), *in vitro*, to imitate a proinflammatory challenge. The indicators of oxidative stress were quantified by spectrophotometry. After 48 h exposure to LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), leukocytes from *T. truncatus gilli* displayed significantly higher superoxide radical ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) production, generally higher antioxidant defenses, and significantly lower protein carbonyl concentrations compared to leukocytes from *H. sapiens*. These results suggest that, under cell culture conditions, the antioxidant defenses in leukocytes from *T. truncatus gilli* provide additional protection against proinflammatory challenges in comparison to leukocytes from humans. The increased response to LPS in the leukocytes of *T. truncatus gilli* compared to *H. sapiens* is likely an adaptive advantage resulting from a fully aquatic lifestyle. In the leukocytes of *T. truncatus gilli*, sex and stage of maturity apparently did not influence the indicators of oxidative stress following a proinflammatory response.

**Keywords:** Antioxidant defense, leukocyte, marine mammal, oxidative stress, reactive oxygen species

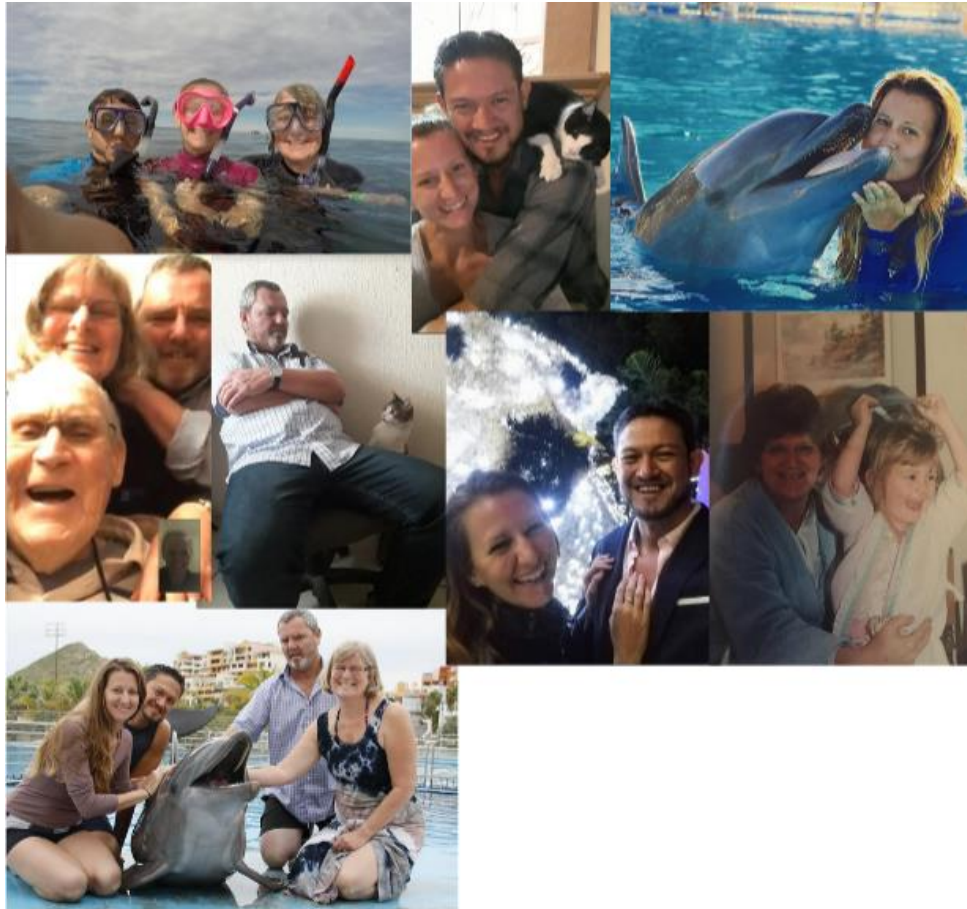
ORCID number - 0000-0003-2917-4525



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

## Dedicatoria

This thesis is dedicated to my family and the creatures that have inspired my journey



## **Agradecimientos**

A CONACyT por la beca otorgada (922584).

A CIBNOR por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A CONACyT (proyecto CB-2016-01-283669) y CIBNOR (Línea Estratégica II. Estrés Oxidativo) por financiar este proyecto.

Al departamento de Posgrado (Leticia, Osvelia, y Tania) por su apoyo y paciencia por mis millones de preguntas durante mis estudios.

A mí Comité Tutorial: Dra. Tania Zenteno Savín, Dr. Ramón Gaxiola Robles y Dra. Claudia Hernández Camacho. Gracias por su paciencia, ánimo, y amistad. Y gracias por tomarse el tiempo para convertirme en un mejor científico.

Al técnico del Laboratorio de Estrés Oxidativo IBQ. Orlando Lugo Lugo y a mis compañeros del Laboratorio, Pablo, y Carlos, por todo su apoyo y paciencia.

To my friends, thank you all for your advice and support throughout the last 2 years.

To my family (Poppa, Gran, Aunt Joan, Uncle Jack) for their love and support throughout my life and all of my adventures.

To my mom and dad. Thank you for always pushing me in the direction of my dreams and for providing unconditional love and support throughout. I know it could not have been easy for either one of you. I will never be able to explain to you guys how much it meant and still means to me. I love you both.

And finally, to the love of my life, Hever. I cannot thank you enough for every single action you took to show me your support, your love, and to make my life easier, not only on the days of stress, but on our “days of relax” as well. I cannot imagine what my life would be without you, and I don’t ever want to. You were the missing puzzle piece that made my world complete. Thank you.

<b>Contenido</b>	
<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	xi
<b>Abreviaturas</b> .....	xiv
<b>Definiciones</b> .....	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	10
2.1. Concentración y dosis letal de lipopolisacáridos en mamíferos.....	10
2.2. Producción de radical superóxido en mamíferos terrestres y marinos .....	11
2.3. Defensas antioxidantes en mamíferos terrestres y marinos .....	13
2.4. Daño oxidativo en respuesta a lipopolisacáridos en mamíferos terrestres y marinos. ....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	19
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	20
5.1. Objetivo general .....	20
5.2. Objetivos particulares.....	20
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
6.1. Colecta de muestras de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> .....	21
6.2. Aislamiento de leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> .....	22
6.3. Viabilidad y concentración letal en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus</i> <i>gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos .....	22
6.4. Conteo diferencial de leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> .....	24
6.5. Exposición de leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> a lipopolisacáridos .....	24
6.6. Producción de radical superóxido en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus</i> <i>gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos .....	25
6.7. Defensas antioxidantes en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	26
6.8. Daño oxidativo en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos .....	27
6.9. Proteínas totales en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	29
6.10. Análisis estadístico .....	29
<b>7. RESULTADOS</b> .....	31
7.1. Viabilidad celular y concentración letal en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops</i> <i>truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	31



7.2. Cuento diferencial de leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	36
7.3. Producción de radical superóxido en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos .....	39
7.4. Defensas antioxidantes en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	40
7.5. Daño oxidativo en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos .....	44
7.6. Respuesta de leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	46
7.6.1. Cuento diferencial de leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	46
7.6.2. Producción de radical superóxido en leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	52
7.6.3. Actividad enzimática en leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	54
7.6.4. Daño oxidativo en leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	59
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	63
8.1. Viabilidad celular y concentración letal en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	63
8.2. Cuento diferencial de leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	63
8.3. Producción de radical superóxido en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos .....	68
8.4. Defensas antioxidantes en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos.....	70
8.5. Daño oxidativo en leucocitos de <i>Homo sapiens</i> y <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a lipopolisacáridos .....	72
8.6. Cuento diferencial de leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	74
8.6.1. Producción de radical superóxido en leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	75
8.6.2. Actividad enzimática en leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	77
8.6.3. Daño oxidativo en leucocitos de <i>Tursiops truncatus gilli</i> en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez .....	78
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	81
9.1. Preguntas sin respuesta (nueva frontera) .....	82
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	84
<b>11. ANEXOS</b> .....	98

## Lista de figuras

- Figura 1.** Producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y la interacción de estas moléculas con las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. O<sub>2</sub>, oxígeno; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical superóxido; <sup>•</sup>OH, radical hidroxilo; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; H<sub>2</sub>O, agua; NADPH oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; HX, hipoxantina; XO, xantina oxidasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; AA, amino ácido; ADN, ácido desoxirribonucleico; ATP, trifosfato de adenosina; Fe<sup>++</sup>, hierro (II); X, función inhibitorio. Figura modificada de Cocuzza *et al.* (2007) y Misra *et al.* (2009) .....2
- Figura 2.** Mecanismos propuestos para la producción del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) durante los períodos de isquemia tisular, como los que ocurren durante la respuesta de inmersión de los mamíferos marinos. ATP, trifosfato de adenosina; AMP, monofosfato de adenosina; HX, hipoxantina; O<sub>2</sub>, oxígeno; XO, xantina oxidasa. Figura modificada de McCord, (1985) .....4
- Figura 3.** Interacciones entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes enzimáticas y no-enzimáticas. O<sub>2</sub>, oxígeno; e<sup>-</sup>, electrón; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical superóxido; SOD, superóxido dismutasa; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; Fe<sup>++</sup>, hierro (II); Fe<sup>+++</sup>, hierro (III); HO<sup>•</sup>, radical hidroxilo; GPx, glutatión peroxidasa; CAT catalasa; H<sub>2</sub>O, agua; GSH, glutatión; GSSG, disulfuro de glutatión; GR, glutatión reductasa; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADP<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada. Figura modificada de Garrel *et al.* (2010) .....8
- Figura 4.** Mortalidad (%) de leucocitos de *Homo sapiens* (n = 11) durante 24 horas (rojo) y 48 horas (verde) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 7) durante 24 horas (azul) y 48 horas (rosa) en cultivo primario expuestos a lipopolisacáridos (LPS, μg LPS mL<sup>-1</sup>). Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Las líneas punteadas representan la relación ligeramente lineal estimada a partir de los datos (R<sup>2</sup> = 0.62 a 24 horas) y la relación no lineal estimada a partir de los datos (R<sup>2</sup> = 0.22 a 48 horas) en *Tursiops truncatus gilli* y la relación ligeramente lineal estimada a partir de los datos (R<sup>2</sup> = 0.67 a 24 horas) y la relación lineal estimada a partir de los datos (R<sup>2</sup> = 0.77 a 48 horas) en *Homo sapiens* .....31
- Figura 5.** Conteo promedio de (A) neutrófilos, (B) linfocitos, (C) eosinófilos, (D) monocitos, y (E) basófilos de *Homo sapiens* (n = 10) (rojo y verde) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) (azul y rosa) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>; rojo y azul) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>; verde y rosa) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie con tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> dentro de la misma especie y concentración de LPS con tiempos de incubación diferentes que 24 hora.....38
- Figura 6.** Producción de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, nanomoles miligramo<sup>-1</sup> de proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) (rojo y verde) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) (azul y rosa) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>; rojo y azul) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>; verde y rosa) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro

de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos,  
<sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación .....40

**Figura 7.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) (rojo y verde) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) (azul y rosa) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>, rojo y azul) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>, verde y rosa) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación .....43

**Figura 8.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteínas), y (B) carbonilos proteicos (µmol miligramo<sup>-1</sup> de proteínas) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) (rojo y verde) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) (azul y rosa) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>; rojo y azul) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>; verde y rosa) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.....45

**Figura 9.** Conteo promedio de (A) neutrófilos, (B) linfocitos, (C) eosinófilos, (D) monocitos, y (E) basófilos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n= 5) (azul oscuro y azul claro) y hembras (n = 7) (rosa oscuro y rosa claro) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>; azul oscuro y rosa oscuro) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>; azul claro y rosa claro) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre sexos, <sup>Δ</sup> dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la mismo sexo con tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de LPS con tiempos de incubación diferentes que 24 horas.....48

**Figura 10.** Conteo promedio de (A) neutrófilos, (B) linfocitos, (C) eosinófilos, (D) monocitos, y (E) basófilos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n= 5) (morada y verde) y maduros (n = 7) (roja y azul) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>; morada y roja) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>; verde y azul) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre estadios de madurez, <sup>Δ</sup> dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez con tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> dentro del mismo estadio de madurez y la misma concentración de LPS con tiempos de incubación diferentes que 24 horas.....51

**Figura 11.** Concentración de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, nanomoles miligramo<sup>-1</sup> proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n= 5) (azul oscuro y azul claro) y hembras (n = 7) (rosa oscuro y rosa claro) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>; azul oscuro y rosa oscuro) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>; azul claro y rosa claro) de lipopolisacáridos (LPS) a

24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedios  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos,  $\Delta$  dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.....53

**Figura 12.** Producción de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ , nanomoles miligramo<sup>-1</sup> proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n= 5) (morada y verde) y maduros (n = 7) (roja y azul) en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ , morada y roja) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ , verde y azul) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación .....54

**Figura 13.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n= 5) (azul oscuro y azul claro) y hembras (n = 7) (rosa oscuro y rosa claro) en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ; azul oscuro y rosa oscuro) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ; azul claro y rosa claro) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedios  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos,  $\Delta$  dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación .....56

**Figura 14.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n= 5) (morada y verde) y maduros (n = 7) (roja y azul) en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ , morada y roja) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ , verde y azul) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.....58

**Figura 15.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) carbonilos proteicos ( $\mu\text{mol miligramo}^{-1}$  de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n = 5) (azul oscuro y azul claro) y hembras (n = 7) (rosa oscuro y rosa claro) en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ; azul oscuro y rosa oscuro) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ; azul claro y rosa claro) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos,  $\Delta$  dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con

diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación .....60

**Figura 16.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) carbonilos proteicos (μmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n = 5) (morada y verde) y maduros (n = 7) (roja y azul) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>, morada y roja) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>, verde y azul) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre estadios de madurez, <sup>Δ</sup> dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación .....62

## Lista de tablas

**Tabla I.** Concentración letal media (LC<sub>50</sub>) de lipopolisacáridos (LPS) en *Homo sapiens* (n = 11) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 7) calculada con la ecuación de la recta de mortalidad celular, la concentración natural y la concentración logaritmo base 10 (LOG<sub>10</sub> concentración) de LPS.....33

**Tabla II.** Concentración letal calculada utilizando el método probit de Finney, para leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* (n = 5), en cultivo primario expuestos a lipopolisacáridos en concentraciones de 0, 3, 5, 7 y 10 µg LPS mL<sup>-1</sup> después de 48 horas y de *Homo sapiens* (n = 7), en cultivo primario expuestos a lipopolisacáridos en concentraciones de 0, 2, 3, 5, 7 y 10 µg LPS mL<sup>-1</sup> después de 48 horas. Se presentan los intervalos de confianza fiduciales al 95%, con sus respectivos límites inferior y superior.....35

## Lista de tablas en anexos

**Tabla IA.** Comparación interespecífica e intraespecífica de los leucogramas de *Homo sapiens* (n = 10) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) como factor de la concentración de lipopolisacáridos (LPS; µg LPS mL<sup>-1</sup>) y el tiempo de incubación (horas). Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies en el mismo tiempo de incubación y la misma concentración de lipopolisacáridos, <sup>Δ</sup> en la misma especie y al mismo tiempo de incubación pero con concentraciones diferentes de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> en tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> en el tiempo diferente que 24 horas.....98

**Tabla IIA.** Producción de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, nanomoles miligramo<sup>-1</sup> de proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.....99

**Tabla IIIA.** Actividad enzimática (U mg<sup>-1</sup> proteínas) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario expuestos a lipopolisacáridos (LPS; 10 µg LPS mL<sup>-1</sup> por 24 o 48 h). Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro del mismo especie y tiempo de incubación, pero con concentraciones diferentes de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo especie y concentración de lipopolisacáridos, pero con tiempos de incubación diferentes .....100

**Tabla IVA.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), y (B) carbonilos proteicos (µmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.....101

**Tabla VA.** Conteo diferencial de leucocitos en las muestras de *Tursiops truncatus gilli* machos (n = 5) y hembras (n = 7) previo (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>) y posterior (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) a exposición a lipopolisacáridos (LPS). Los resultados se muestran como promedio ± error estándar. Diferencias

significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos en el mismo tiempo de incubación y concentración de lipopolisacáridos,  $\Delta$  en el mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> en tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> en tiempos diferente que 24 horas con la misma concentración de lipopolisacáridos.....102

**Tabla VIA.** Conteo diferencial de leucocitos en las muestras de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros ( $n = 5$ ) y maduros ( $n = 7$ ) previo ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) y posterior ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a exposición a lipopolisacáridos (LPS). Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez en el mismo tiempo de incubación y la misma concentración de lipopolisacáridos,  $\Delta$  en el mismo estadio de madurez y al mismo tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> en tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> en el tiempo diferente que 24 horas con la misma concentración de lipopolisacáridos.....103

**Tabla VIIA.** Producción de radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ , nanomoles miligramo<sup>-1</sup> de proteína minuto<sup>-1</sup>) de los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* (A) machos ( $n = 5$ ) y hembras ( $n = 7$ ), y (B) inmaduros ( $n = 5$ ) y maduros ( $n = 7$ ) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos / estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo sexo / estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo / estadio de madurez y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.....104

**Tabla VIIIA.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos ( $n = 5$ ) y hembras ( $n = 7$ ) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos,  $\Delta$  dentro del mismo sexo y tiempo de incubación, pero con concentraciones diferentes de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y concentración de lipopolisacáridos, pero con tiempos de incubación diferentes .....105

**Tabla IXA.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros ( $n = 5$ ) y maduros ( $n = 7$ ) en cultivo primario expuestos a lipopolisacáridos (LPS;  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  por 24 o 48 h) separados por estadio de madurez. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo estadio madurez y tiempo de incubación, pero con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y concentración de lipopolisacáridos, pero con tiempos de incubación diferentes .....106

**Tabla XA.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) carbonilos proteicos ( $\mu\text{mol miligramo}^{-1}$  de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos ( $n = 5$ ) y hembras ( $n = 7$ ) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos,  $\Delta$  dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.....107

**Tabla XIA.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) carbonilos proteicos (μmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre estadios de madurez, <sup>Δ</sup> dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación .....108



## Abreviaturas

- **ADN**- Ácido desoxirribonucleico
- **AG**- Ácidos grasos
- **AMP**- Monofosfato de adenosina
- **ATP**- Trifosfato de adenosina
- **CAT**- Catalasa
- **CDNB**- 1-Cloro 2, 4-dinitrobenceno
- **CI**- Intervalo de confianza
- **CPHs**- Células polimorfonucleares humanas
- **Cu, Zn-SOD**- Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
- **DPNH**- Dinitrofenil hidrazina
- **EDTA**- Ácido etilendiaminotetraacético
- **EDTA- K<sub>2</sub>**- Ácido etileno diaminotetracético dipotásico
- **ERN**- Especies reactivas de nitrógeno
- **ERO**- Especies reactivas de oxígeno
- **ETC**- Cadena de transporte de electrones
- **GPx**- Glutación peroxidasa
- **GR**- Glutación reductasa
- **GSH**- Glutación reducido
- **GSSG**- Glutación disulfuro (glutación oxidado)
- **GST**- Glutación S-transferasa
- **H<sub>2</sub>O**- Agua
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**- Peróxido de hidrogeno
- **HCl**- Ácido hidroclicrico
- **HO<sup>•</sup>**- Radical hidroxilo
- **HX**- Hipoxantina
- **IP**- Intraperitoneal
- **LC<sub>25</sub>**- Concentración letal 25; concentración a la que el 25% de la población muere
- **LC<sub>50</sub>**- Concentración letal media; concentración a la que el 50% de la población muere
- **LD<sub>50</sub>**- Dosis letal media; dosis a la que el 50% de la población muere
- **LD<sub>80</sub>**- Dosis letal 80; dosis a la que el 80% de la población muere

- **LD<sub>100</sub>**- Dosis letal 100; dosis a la que el 100% de la población muere
- **LDLs**- Lipoproteínas de baja densidad
- **LPS**- Lipopolisacáridos
- **LPS (LPB)-CD14-TLR4**- Unión a proteína de unión al lipopolisacáridos- cúmulo de diferenciación 14- receptor 4 tipo toll
- **MFA**- Acetato de miristato de forbol
- **Mn-SOD**- Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
- **mt-ADN**- ADN mitocondrial
- **NAPDH**- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **NBT**- Nitroazul de tetrazolio
- **NS**- No significativa
- **O<sub>2</sub>**- Oxígeno molecular
- **O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**- Radical superóxido
- **<sup>•</sup>OH**- Radical hidroxilo
- **SC**- Subcutánea (inyección)
- **SOD**- Superóxido dismutasa
- **TBA**- Ácido tiobarbitúrico
- **TBARS**- Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
- **TCA**- Ácido tricloroacético
- **TEP**- 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano
- **UFC**- Unidades formadores de colonias
- **X**- Xantina
- **XO**- Xantina oxidasa

## Definiciones

- **Agente tóxico-** Compuesto que tiene la capacidad de estimular reacciones adversas en un organismo, lo que eventualmente conduce a modificaciones en la estructura y función celular y, en casos más graves, a la muerte del organismo (Arya *et al.*, 2018)
- **Agranulocitos-** Leucocitos sin gránulos en el citoplasma (monocitos y linfocitos) (Chmielewski *et al.*, 2016)
- **Análisis probit-** Prueba estadística que se utiliza para demostrar la relación entre la concentración de una toxina y la mortalidad de los organismos como resultado de la exposición a la toxina (Arya *et al.*, 2018)
- **Antioxidantes-** Sustancias que tienen las funciones de prevenir la síntesis descontrolada de especies reactivas, de bloquear la interacción de éstas con otras moléculas o de catalizar su transformación a moléculas menos reactivas (Fridovich y Freeman, 1986; Wilhelm Filho *et al.*, 2002; Lesser, 2006; Halliwell 2007)
- **Antioxidantes enzimáticos-** Enzimas con función antioxidante que catalizan reacciones específicas (Halliwell y Gutteridge, 1999)
- **Antioxidantes no-enzimáticos-** Moléculas con función antioxidante que no tienen actividad enzimática y, generalmente, no participan en reacciones específicas (Halliwell y Gutteridge, 1999)
- **Apnea-** Suspensión de la respiración
- **Apoptosis-** Proceso de muerte celular programada, no inflamatorio, involucrado en procesos como el desarrollo, la morfogénesis y la regulación inmune (Fiers *et al.*, 1999, Kevin *et al.*, 2005)
- **Bradycardia-** Disminución en la frecuencia cardíaca, por debajo de aquella registrada en estado de reposo; en mamíferos, esta condición ocurre durante la inmersión como parte de la respuesta al buceo (Noren *et al.*, 2004)
- **Cariopicnosis-** Proceso fisiológico que produce condensación y fragmentación del núcleo durante la apoptosis en leucocitos senescentes (Valenciano *et al.*, 2013)
- **Células polimorfonucleares-** Células fagocíticas que actúan como la primera línea de defensa durante procesos inflamatorios como resultado de la invasión bacteriana y parasitaria (Colotta *et al.*, 1992)
- **Conteo diferencial-** Medida de la cantidad absoluta de cada tipo de leucocito en una muestra de sangre (Thrall *et al.*, 2006)
- **Conteo diferencial relativo-** Cantidad de cada tipo de leucocito basado en el conteo diferencial de 100 células dentro de una muestra (Arneth, 2016)
- **Daño oxidativo-** Daño a moléculas o tejidos causado por las especies reactivas (Halliwell, 2007)

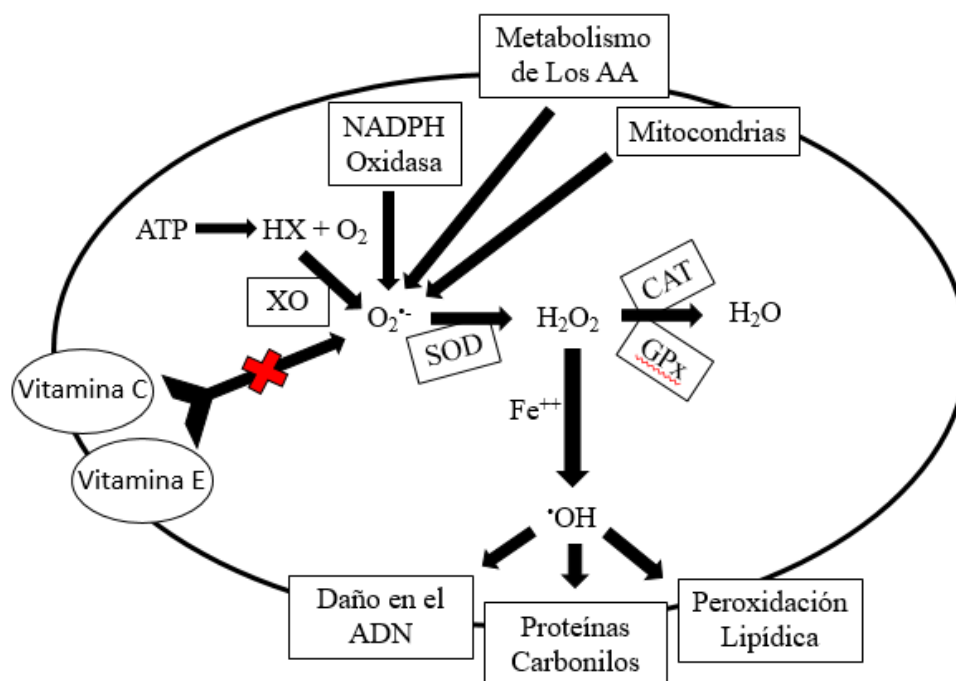
- **Especies reactivas de oxígeno-** Agentes oxidantes derivados del oxígeno, que incluyen moléculas radicales libres y no radicales (Sies y Cadenas, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1990; McCord, 1985)
- **Estrés oxidativo-** Condición generada por el desequilibrio entre las moléculas oxidantes y las defensas antioxidantes a favor de las primeras de tal manera que se induce daño oxidativo (Sies y Cadenas, 1985; Repine *et al.*, 1997; Birben *et al.*, 2012)
- **Eupnea-** Frecuencia respiratoria normal
- **Granulocitos-** Tipo de leucocitos con gránulos en el citoplasma (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) (Chmielewski *et al.*, 2016)
- **Hipoxia-** Disminución de la disponibilidad de oxígeno en los tejidos (Nishi *et al.*, 2008)
- **Inmunidad adaptativa-** Inmunidad por células y procesos sistémicos altamente especializados, característica de vertebrados, que ayuda a proteger contra los patógenos mediante la memoria inmunológica y receptores de reconocimiento de antígeno proporcionados por los linfocitos T y B diferenciados; también conocida como inmunidad adquirida o específica (Hoffmann *et al.*, 1999; Iwasaki y Medzhitov, 2010)
- **Inmunidad innata-** Una forma de defensa no específica encontrada en sistemas biológicos que actúa como la primera línea de defensa contra los patógenos; los componentes celulares incluyen fagocitos que actúan para destruir patógenos y tejidos lesionados y/o muertos, generalmente por medio de especies reactivas (Keogh *et al.*, 2011)
- **Intervalo de confianza fiducial-** En el análisis probit, para un intervalo de confianza fiducial, la probabilidad (%) de que el parámetro de población se encuentre dentro del intervalo es (x) (Clopper y Pearson, 1934)
- **Isquemia-** Restricción o disminución del flujo sanguíneo (Zenteno-Savín *et al.*, 2012, Granger y Kvietyts, 2015)
- **LC<sub>25</sub>-** Concentración letal 25; concentración de una toxina que induce la muerte del 25% de la población expuesta a la sustancia
- **LC<sub>50</sub>-** Concentración letal 50; concentración de una toxina que induce la muerte del 50% de la población expuesta a la sustancia (Boyd, 2005)
- **Modelo probit de Finney-** Modelo que permite la cuantificación de la relación entre la intensidad de un estímulo (por ejemplo, la concentración de una toxina) y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo (porcentaje de mortalidad) (Arya *et al.*, 2018)
- **Necrosis-** Tipo de muerte celular; carece de las características de la autofagia y la apoptosis (Golstein y Kroemer, 2006)
- **Radicales libres-** Especies reactivas, moléculas oxidantes, que poseen un electrón no apareado (Sies y Cadenas, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1990; McCord, 1985)
- **Reperusión-** Restauración del flujo sanguíneo después de un proceso de isquemia (Granger y Kvietyts, 2015)

- **Respuesta al buceo-** Proceso reflejo observado en animales, como los mamíferos cuando bucean, que se caracteriza por la disminución del ritmo cardíaco, vasoconstricción periférica e isquemia a la mayoría de los tejidos (Elsner *et al.*, 1969; Ridgway, 1986)
- **Vasoconstricción periférica-** Disminución de la perfusión sanguínea en el sistema vascular periférico, que ocurre como parte de la respuesta al buceo como ayuda en la conservación de las reservas de oxígeno en la sangre, esenciales para el sistema nervioso central (Kooyman y Ponganis, 1998; Allen y Vázquez-Medina, 2019)
- **Viabilidad celular-** Expresión de la sobrevivencia de células posterior a la exposición a una toxina o fármaco, calculada como el porcentaje de células muertas con relación al total de células expuestas (Mitchell *et al.*, 2002)

## 1. INTRODUCCIÓN

En condiciones fisiológicas normales, la producción de moléculas oxidantes y antioxidantes ocurre en un estado de equilibrio (Halliwell y Gutteridge, 1999). Sin embargo, bajo situaciones que inducen alteraciones metabólicas, como el ejercicio, la inflamación e infección y los ciclos de hipoxia-reperfusión tisular, se favorece la producción de moléculas oxidantes (Ishii *et al.*, 2000). El desequilibrio entre las moléculas oxidantes y las defensas antioxidantes produce estrés oxidativo en organismos, bien sea por el aumento de la producción de oxidantes, la disminución de los antioxidantes, o ambos (Sies y Cadenas, 1985; Repine *et al.*, 1997; Birben *et al.*, 2012). En esta investigación, analizamos los efectos de un reto proinflamatorio en los indicadores de estrés oxidativo en mamíferos marinos y terrestres.

En sistemas biológicos, las moléculas oxidantes que han sido estudiadas más ampliamente son las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Sies y Cadenas, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1999). Las ERO se sintetizan principalmente dentro de la membrana mitocondrial y el retículo endoplásmico, pero también se sintetizan en fagocitos durante reacciones inflamatorias a agentes tóxicos (Repine *et al.*, 1997; Lesser, 2006). El radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), una de las principales ERO en sistemas biológicos, se produce en las mitocondrias, específicamente en la cadena de transporte de electrones (ETC), y puede generarse a partir de la actividad de enzimas como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa o xantina oxidasa (XO) (Repine *et al.*, 1997; Halliwell y Gutteridge, 1999; Birben *et al.*, 2012) (**Fig. 1**).



**Figura 1.** Producción de las especies reactivas de oxígeno y la interacción de estas moléculas con las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.  $O_2$ , oxígeno;  $O_2^{\bullet-}$ , radical superóxido;  $\bullet OH$ , radical hidroxilo;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $H_2O$ , agua; NADPH oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; HX, hipoxantina; XO, xantina oxidasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; AA, amino ácido; ADN, ácido desoxirribonucleico; ATP, trifosfato de adenosina;  $Fe^{++}$ , hierro (II); X, función inhibitoria. Figura modificada de Cocuzza *et al.* (2007) y Misra *et al.* (2009).

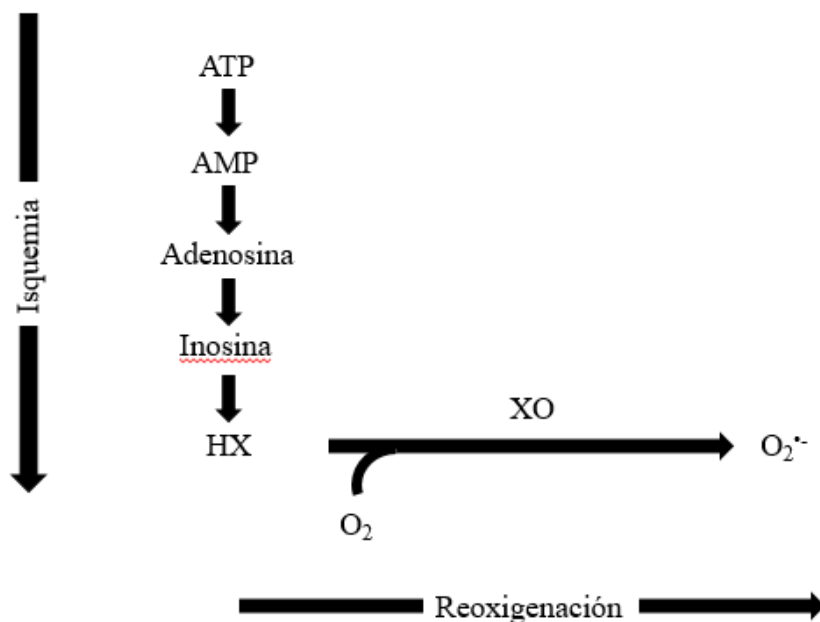
Más de 5,000 especies de mamíferos habitan en varios biomas, incluidos los ecosistemas terrestres y marinos (Wilson y Reeder, 2005). A través del estudio del registro fósil, la evidencia apoya la teoría de que los mamíferos marinos pasaron de los tetrápodos terrestres a los estilos de vida anfibios o totalmente acuáticos de forma independiente en al menos siete linajes (Uhen, 2007). Los cetáceos (ballenas, delfines y marsopas) hicieron la transición entre los tipos de hábitat a principios del Eoceno y han tenido más de 50 millones de años para adaptarse a un estilo de vida totalmente acuático (Houssaye *et al.*, 2015). A diferencia de los mamíferos marinos, los primates mantuvieron un estilo de vida terrestre a lo largo de su evolución, y los humanos modernos (*Homo sapiens*) aparecieron por primera vez en el registro fósil en el Pleistoceno medio a tardío (hace más de 400,000 años) (Lovejoy *et al.*, 2009; Stringer, 2016).

Cetáceos, como los delfines nariz de botella o tursiones (*Tursiops truncatus*), mantienen un estilo de vida totalmente acuático y entran frecuentemente en períodos de apnea para alimentarse, migrar y aparearse. En comparación con los humanos, los mamíferos marinos tienen 10 a 15

veces más mioglobina (aproximadamente, 25% de las reservas de O<sub>2</sub>) en músculo y más del doble la cantidad de hemoglobina (65-71% de las reservas de O<sub>2</sub>) circulante; se ha encontrado que la concentración de estas proteínas de unión al oxígeno aumenta proporcionalmente con la capacidad (tiempo y profundidad) de buceo de cada especie e individuo (Thorson y Le Boeuf, 1994; Kooyman y Ponganis, 1998; Ponganis *et al.*, 2003). Con una mayor capacidad para almacenar y utilizar oxígeno, así como una mayor tolerancia a la hipoxia, los mamíferos marinos pueden agotar casi por completo sus reservas de oxígeno en sangre mientras realizan inmersiones repetitivas (Meir *et al.*, 2009). El cese de la respiración inicia la respuesta al buceo, caracterizada por bradicardia, vasoconstricción periférica y, en consecuencia, isquemia a la mayoría de los tejidos; sólo los tejidos sensibles a la hipoxia, como el sistema nervioso central, mantienen la perfusión continua (Elsner *et al.*, 1969; Ridgway, 1986). Durante un buceo, los alvéolos se colapsan y, con la desviación del flujo sanguíneo pulmonar, el intercambio de gases entre los pulmones y la sangre capilar es mínimo (Kooyman y Ponganis, 1998; Ponganis, 2011). Cuando los mamíferos marinos finalizan el buceo y de regreso en la superficie, con la eupnea, los alvéolos se vuelven a expandir, se revierten la bradicardia, vasoconstricción periférica e isquemia, y los tejidos se perfunden con sangre rica en oxígeno (Ponganis, 2011).

Durante los ciclos de isquemia/reperfusión que se presentan en mamíferos marinos con cada buceo, se producen ERO, como O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (McCord, 1985). Estas ERO se producen durante la isquemia por el uso de las reservas de O<sub>2</sub> en los tejidos (Kevin *et al.*, 2005) y a través del catabolismo de adenosín trifosfato (ATP); en este proceso se producen ERO a partir de la producción de xantina (X) y ácido úrico a partir de hipoxantina (HX) a través de la acción catalítica de xantina oxidasa (XO) (**Fig. 2**). Durante la reperfusión, se producen ERO cuando los electrones acumulados en la ETC reaccionan con O<sub>2</sub> (Granger y Kviety, 2015). En cada caso, la producción intracelular de ERO parece estar correlacionada con las concentraciones de O<sub>2</sub> y puede provocar daño a los tejidos (Freeman y Crapo, 1981; Turrens *et al.*, 1982).





**Figura 2.** Mecanismos propuestos para la producción del radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) durante los períodos de isquemia tisular. ATP, trifosfato de adenosina; AMP, monofosfato de adenosina; HX, hipoxantina;  $O_2$ , oxígeno; XO, xantina oxidasa. Figura modificada de McCord, (1985).

Los estudios con *T. truncatus* sugieren que estos mamíferos suelen bucear, en promedio, menos de cinco minutos y a profundidades de hasta 20 m, y que el número de buceos puede promediar 124 eventos por hora (Mate *et al.*, 1995). Durante los ciclos de isquemia, los mamíferos que bucean pueden experimentar hipoxia tisular que puede progresar con una mayor duración del buceo y el uso de las reservas de oxígeno (Elsner *et al.*, 1998). Los humanos (*Homo sapiens*) tienen la capacidad de presentar la respuesta al buceo, pero en menor medida en comparación con los mamíferos marinos (Wartzok, 2008). *H. sapiens*, de manera rutinaria, rara vez experimenta fluctuaciones en la disponibilidad de oxígeno, excepto en períodos de ejercicio intenso cuando aumenta el consumo de oxígeno en el músculo esquelético; en estos casos, el flujo de oxígeno de la sangre a los músculos activos puede aumentar hasta 100 veces, resultando en una disminución del oxígeno en sangre (Davies, 2000).

En vertebrados, incluyendo mamíferos marinos y terrestres, la exposición a patógenos resulta en procesos infecciosos o inflamatorios que también aumentan la producción de ERO (Ishii *et al.*, 2000). Los lipopolisacáridos (LPS) son agentes tóxicos que actúan como un elemento estructural principal en la membrana externa de las bacterias gram negativas, incluida *Escherichia coli* (Miller *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2014). La endotoxina asociada con LPS, el lípido A, es una cadena

de polisacárido reconocida como un factor importante de enfermedades en humanos y animales (Ulevitch y Tobias, 1999). La respuesta inmune generalmente comienza dentro de las horas o días posteriores a la presencia del patógeno, a través del reconocimiento de moléculas clave, como LPS; LPS se ha relacionado a infecciones graves en *H. sapiens* y tiene el potencial de inducir choque séptico, disfunción orgánica y muerte (Davis *et al.*, 2008; Chuang *et al.*, 2011). Numerosos informes han asociado eventos de mortalidad masiva en mamíferos marinos con varios patógenos (Geraci *et al.*, 1982; Dietz *et al.*, 1989; Fire *et al.*, 2015); en algunas áreas, las infecciones bacterianas, representan el 31% de la mortalidad registrada para *T. truncatus* (McFee y Lipscomb, 2009).

Para determinar la letalidad de una toxina, como LPS, se puede calcular la concentración de dicha toxina que induce la muerte del 50% (LC<sub>50</sub>) de la población expuesta a la sustancia (Boyd, 2005). La LC<sub>50</sub> generalmente se determina gráfica o estadísticamente siguiendo los resultados obtenidos después de la exposición a concentraciones variables de los tóxicos deseados por 24, 48, 72 y/o 96 horas (Boyd, 2005). Alternativamente, la LC<sub>50</sub> de una toxina se puede determinar estadísticamente mediante el uso de un análisis probit, como el modelo probit de Finney (1952). Se ha sugerido que la LC<sub>50</sub> de una toxina es menor a mayor tiempo de exposición, y que la concentración de un compuesto tóxico puede disminuir con el tiempo, a través de su absorción y/o degradación química/biológica (Boyd, 2005). La LC<sub>50</sub> de un patógeno puede variar entre especies, serotipo de patógeno, con diferentes condiciones ambientales (como temperatura), e incluso entre individuos de la misma especie, probablemente como resultado de diferencias en edad, género y alimentación (Caroff *et al.*, 2002; Arya *et al.*, 2018). Debido a los riesgos asociados y las restricciones éticas, se han realizado pocos estudios para determinar la LC<sub>50</sub> de endotoxina utilizando humanos y otros grandes mamíferos (Copeland *et al.*, 2005; Miyashita *et al.*, 2012).

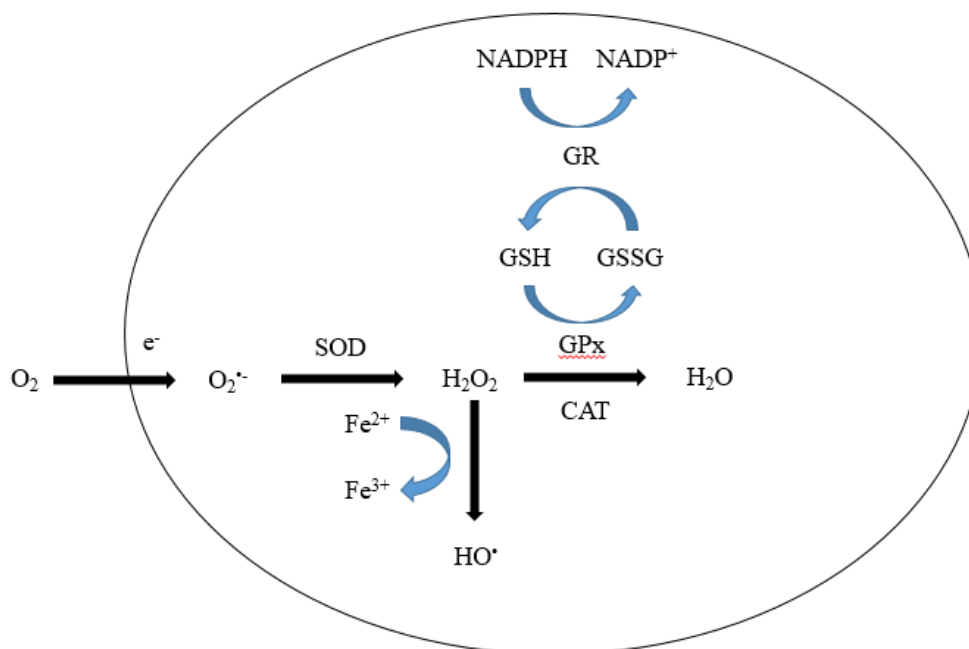
Para mantener la homeostasis durante una infección por patógenos, todos los organismos, desde bacterias hasta vertebrados y plantas, poseen inmunidad innata como mecanismo de defensa (Keogh *et al.*, 2011; Bikard y Marraffini, 2012). Los vertebrados y las bacterias poseen, además, inmunidad adaptativa (Iwasaki y Medzhitov, 2010; Miller *et al.*, 2005; Bikard y Marraffini, 2012). La inmunidad innata de vertebrados involucra numerosos tipos de células, incluidas fagocíticas, como los macrófagos y los neutrófilos, y actúa para proteger al huésped rápidamente de la exposición a un patógeno (Desforges *et al.*, 2016). A través de vías de señalización

complejas, el sistema inmune innato reconoce patógenos, incluyendo los LPS, como agentes tóxicos, y tras la unión de pequeñas cantidades de LPS con el complejo de proteínas de unión lipopolisacáridos-cúmulo de diferenciación 14- receptor 4 tipo toll (LPS (LPB)-CD14-TLR4), se produce una rápida respuesta proinflamatoria (Ulevitch y Tobias, 1999). Aunque las células huésped de mamíferos tienen la capacidad de distinguir entre su propio ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ADN de bacterias, una respuesta inmune sólo puede iniciarse mediante la penetración celular, no simplemente a través de interacciones a nivel de la superficie celular (Stacey *et al.*, 1996). La activación de leucocitos inducida por LPS, mediante cascadas de señalización corriente abajo, resulta en la liberación de mediadores proinflamatorios, como la NADPH oxidasa resultando en una explosión respiratoria, que aumenta la producción de ERO en las mitocondrias de células fagocíticas, contribuyendo a la destrucción de patógenos y tejidos dañados por procesos de fagocitosis (Fridovich y Freeman, 1986; Halliwell y Gutteridge, 1999; Nishi *et al.*, 2008). De esta manera, la fase proinflamatoria se puede resolver. Sin embargo, en casos más extremos, la producción continua de ERO puede resultar en el reclutamiento de más fagocitos, lo que esencialmente provoca la activación de la respuesta inflamatoria como parte de la inmunidad adaptativa (Tan *et al.*, 2016). Los mamíferos tienen un amplio espectro de sensibilidad a diferentes endotoxinas y su capacidad para provocar infección y choque séptico; pero, en general, se considera *H. sapiens* como el modelo más sensible a los efectos de la endotoxina (Lehmann *et al.*, 1987; Wolff, 1973).

Durante los procesos de infección e inflamación, así como durante las alteraciones en el metabolismo del O<sub>2</sub>, como se observa durante la isquemia y la reperfusión, la exposición a ERO puede producir cambios en el equilibrio iónico debido a daños en la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y puede cesar la división celular, necrosis y apoptosis celular, así como otros efectos perjudiciales (Halliwell y Gutteridge, 1999; Halliwell, 2007). En mamíferos terrestres, incluyendo *H. sapiens*, el aumento en la producción de ERO resultante de procesos isquémicos, como infarto al miocardio, induce daño oxidativo que puede, incluso, amenazar la vida del individuo (Fridovich y Freeman, 1986). Sin embargo, en casos menores, el daño a tejidos a través de la peroxidación de lípidos puede afectar la función de la membrana, alterar la permeabilidad y la fluidez de la membrana, así como hacer que las enzimas y los receptores unidos a la membrana se inactiven (Repine *et al.*, 1997). Las ERO, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en exceso pueden dañar el sistema de transporte de electrones mitocondrial, ADN, ADN mitocondrial (mt-ADN), enzimas y puede ingresar en numerosas reacciones al abandonar el sitio de síntesis (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lesser,

2006; Abele *et al.*, 2007). También, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede causar la activación o desactivación de procesos celulares, incluidos los ciclos celulares y la diferenciación, la reparación del ADN, la remodelación de la cromatina y los procesos de renovación automática (Tan *et al.*, 2016). De manera similar, la sobreproducción de ERO puede conducir a daños a proteínas, incluyendo modificaciones de la cadena lateral de aminoácidos, la escisión de los enlaces peptídicos y una mayor susceptibilidad de las proteínas a la degradación (Halliwell y Gutteridge, 1999); por ejemplo, elevadas concentraciones de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generados a partir de la actividad de XO, pueden llevar a la hemólisis de eritrocitos en hámsteres (Repine *et al.*, 1997). La necrosis tisular se considera la respuesta extrema a las ERO (Davies, 2000). La formación del  $\cdot\text{OH}$ , radical altamente reactivo, resulta en una mayor probabilidad de necrosis tisular, oxidación de los lípidos de membrana y la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos a una velocidad controlada por difusión (Fridovich y Freeman, 1986; Repine *et al.*, 1997; Sies, 1997; Lesser, 2006; Regoli y Giuliani, 2014).

Aumentos significativos en las concentraciones de ERO, sin un incremento proporcional en las defensas antioxidantes, se han reportado como una característica central en el envejecimiento y enfermedades, como el cáncer, trastornos neurológicos, asma, diabetes, hipertensión, tabaquismo y malnutrición, entre otros (Darr y Fridovich, 1995; Repine *et al.*, 1997; Birben *et al.*, 2012). En sistemas biológicos, existe una serie de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen las funciones de prevenir la síntesis descontrolada de ERO, de bloquear la interacción de éstas con otras moléculas o de catalizar su transformación a moléculas menos reactivas (Fridovich y Freeman, 1986; Wilhelm Filho *et al.*, 2002; Lesser, 2006; Halliwell 2007). Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST). En contraste con los antioxidantes no enzimáticos, los antioxidantes enzimáticos participan en reacciones específicas (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las actividades de SOD, CAT, GPx, GR, y GST están vinculadas entre sí, así como con el metabolismo de glutatión (Ketterer *et al.*, 1983; Carlberg y Mannervik, 1985; Fridovich y Freeman, 1986; Halliwell y Gutteridge, 1990) (**Fig. 3**).



**Figura 3.** Interacciones entre las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes enzimáticas.  $O_2$ , oxígeno;  $e^-$ , electrón;  $O_2^{\cdot-}$ , radical superóxido; SOD, superóxido dismutasa;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno;  $Fe^{2+}$ , hierro (II);  $Fe^{3+}$ , hierro (III);  $HO^{\cdot}$ , radical hidroxilo; GPx, glutatión peroxidasa; CAT catalasa;  $H_2O$ , agua; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión disulfuro, glutatión oxidado; GR, glutatión reductasa; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADP<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada. Figura modificada de Garrel *et al.* (2010).

En tejidos de mamíferos marinos buceadores, en comparación con los tejidos de mamíferos que no bucean, se han reportado mayores niveles de las defensas antioxidantes y menores niveles de los indicadores de daño oxidativo (Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002; Wilhelm Filho *et al.*, 2002; Cantú-Medellín *et al.*, 2011; Vázquez-Medina *et al.*, 2012). Además, existe evidencia que sugiere que los niveles de antioxidantes en la sangre de mamíferos marinos varían con la capacidad (tiempo y profundidad) de buceo en cada especie (Wilhelm Filho *et al.*, 2002; Righetti *et al.*, 2014). En células de mamíferos marinos y terrestres, se han identificado dos isoformas distintas de SOD; SOD dependiente de cobre y zinc (Cu, Zn-SOD) se encuentra en el citoplasma, mientras que SOD dependiente en manganeso (Mn-SOD) se encuentra dentro de las mitocondrias (Garrel *et al.*, 2010). Ambas isoformas de SOD catalizan la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  (Fridovich y Freeman, 1986). Después de la formación de  $H_2O_2$ , CAT y GPx lo reducen en los peroxisomas y en el citoplasma, respectivamente, a  $H_2O$  (Fridovich y Freeman, 1986) (Figura 3). Durante la conversión de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  por GPx, el glutatión reducido (GSH) se convierte en glutatión disulfuro (glutatión oxidado, GSSG) (Sies y Cadenas, 1985). GST cataliza la

conjugación inicial de GSH con xenobióticos en los procesos de detoxificación celular (Ketterer *et al.*, 1983), mientras que GR cataliza la reducción de GSSG a GSH, dependiente de NADPH, para reciclar el GSH (Carlberg y Mannervik, 1985) (**Fig. 3**).

Entre los antioxidantes no enzimáticos, el GSH se considera uno de los más importantes; participa como cofactor de varias enzimas antioxidantes, juega un papel central en los procesos de desintoxicación y es, por sí mismo, un antioxidante (Carlberg y Mannervik, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1999). Otros de los componentes no enzimáticos incluyen vitaminas A, C y E, ácido úrico, carotenoides y bilirrubina (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las concentraciones y actividades de las moléculas antioxidantes están influenciadas por el estilo de vida, la edad, especie, historia evolutiva y dieta (Darr y Fridovich, 1995; Repine *et al.*, 1997; Halliwell y Gutteridge, 1999). Algunos antioxidantes no enzimáticos se sintetizan en el cuerpo (endógenos), mientras que otros deben incorporarse a partir de la dieta (exógenos) (Drouin *et al.*, 2011).

Usando *T. truncatus gilli* como modelo para mamíferos marinos y *H. sapiens* como modelo para animales terrestres, este trabajo buscó determinar si existen diferencias en los indicadores de estrés oxidativo en los leucocitos de mamíferos marinos y terrestres en respuesta a retos proinflamatorios.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Concentración y dosis letal de lipopolisacáridos en mamíferos

Ben-Shaul *et al.* (2001) calcularon la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de LPS en ratas Wistar (*Mus musculus*) macho de 23 meses de edad y entre 200 y 250 g de peso. El LPS de *E. coli* cepa 055:B5 se diluyó en solución salina con una concentración final de 20 mg mL<sup>-1</sup> y se inyectó por vía intraperitoneal (IP; Ben-Shaul *et al.*, 2001). La tasa de mortalidad observada a las concentraciones de endotoxina de 0.7, 2.0, 10 y 20 mg kg<sup>-1</sup> se determinó como 0, 30, 50 y 80%, respectivamente, 24 horas después de la exposición a la endotoxina (Ben-Shaul *et al.*, 2001). La LD<sub>50</sub> se determinó a 10 mg LPS kg<sup>-1</sup> (Ben-Shaul *et al.*, 2001).

Durante una investigación dedicada a determinar los indicadores de estrés oxidativo en *M. musculus*, Reddy *et al.* (2006) determinaron inadvertidamente la LD<sub>25</sub> de LPS a partir de *E. coli* O127:B8. Los ratones macho, con un peso de 250-300 g y 70-80 días de edad, recibieron una inyección IP de LPS a una dosis de 5 mg kg<sup>-1</sup> (Reddy *et al.*, 2006). Durante las sesiones de monitoreo, se observó un 25% de mortalidad entre las seis y las 24 horas posteriores a la inyección de LPS (Reddy *et al.*, 2006)

Melo *et al.* (2010) calcularon la dosis letal para el 80% (LD<sub>80</sub>), así como la dosis letal para el 100% (LD<sub>100</sub>) de ratones inmuno-deficientes Bagg Albino (tipo BALB/c; *M. musculus*) de seis semanas de edad entre 20 y 25 g de peso. Los ratones se separaron en diferentes grupos de tratamiento basados en la concentración de LPS de *E. coli* cepa 026: B6 y se les administró una única inyección IP (Melo *et al.*, 2010). La tasa de mortalidad se determinó para cada concentración de LPS 8 horas después de la exposición a la endotoxina (Melo *et al.*, 2010). La LD<sub>80</sub> se determinó como 20 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que la LD<sub>100</sub> se determinó como 40 mg kg<sup>-1</sup> (Melo *et al.*, 2010).

Chuang *et al.* (2011) estudiaron la viabilidad celular, el nivel de apoptosis y necrosis en células de carcinoma epitelial de pulmón humano tipo II (células A549) en respuesta a la exposición a 0.1, 0.5, 1 y 10 µg LPS mL<sup>-1</sup> durante 12, 24 y 48 horas. La viabilidad celular se midió usando espectrofotometría; la apoptosis celular se midió aislando células detenidas en la etapa sub-G1 y analizándolas por citometría de flujo; finalmente, la necrosis celular se midió usando un

inmunoensayo fotométrico y se analizaron los productos colorimétricos (Chuang *et al.* 2011). No se observaron diferencias en la viabilidad en las células A549 expuestas a  $0.1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 24 horas ni a  $1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 12 horas; sin embargo, cuando estas células se expusieron a 1 y  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 24 horas, la viabilidad disminuyó en 49% y 74%, respectivamente (Chuang *et al.* 2011). En un bioensayo independiente, después de la exposición a  $1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 24 y 48 horas, la viabilidad de las células A549 disminuyó a 47% y 73%, respectivamente (Chuang *et al.* 2011). No se observó evidencia de apoptosis posterior a la exposición a  $0.1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  después de 24 horas ni después de la exposición a  $1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 12 horas; sin embargo, después de la exposición a  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  por 24 horas, la apoptosis aumentó en un 47% y 68%, respectivamente, y después del tratamiento con  $1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 24 y 48 horas, el nivel de apoptosis en células A549 aumentó en un 53% y 72%, respectivamente (Chuang *et al.* 2011). En las células expuestas a 0.5 y  $1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 24 horas no se observó evidencia de necrosis; sin embargo, en las células expuestas a  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  durante 24 horas se reportó inducción de necrosis celular del 15% (Chuang *et al.* 2011).

Miyashita *et al.* (2012) estudiaron la virulencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7 *in vivo* en cinco ratones Jcl: ICR hembras de cuatro semanas de edad. Previo a la inyección IP, la cepa de *E. coli* se preparó mediante una dilución y suspensión en serie en PBS con 5% de mucina gástrica de cerdo (Miyashita *et al.*, 2012). Se registró el número de individuos que sobrevivieron 18 horas después de la inyección y se calculó la  $LD_{50}$  en  $1.0 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) por individuo según un análisis de regresión logística (Miyashita *et al.*, 2012). Hasta donde sabemos, no existen estudios que determinen la LC o LD en mamíferos marinos después de la exposición a LPS.

## **2.2. Producción de radical superóxido en mamíferos terrestres y marinos**

Smith *et al.* (1994) estudiaron la producción de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en *Homo sapiens*, en individuos sanos, no fumadores y en un rango de edad de 23 a 38 años. Se colectaron macrófagos alveolares mediante lavados pulmonares antes y después de la administración intravenosa de  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  aislado de *E. coli* 0113, a una dosis de  $4 \text{ ng kg}^{-1}$  de peso corporal (Smith *et al.*, 1994). La producción de  $O_2^{\bullet-}$  no fue significativamente mayor en las muestras colectadas después de la administración de endotoxinas en comparación con las muestras colectadas antes de la administración de endotoxinas (Smith *et al.*, 1994). Además, no se reportaron diferencias



significativas en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por los macrófagos alveolares recolectados 1.5 h y 6 h después de la administración de la endotoxina (Smith *et al.*, 1994).

Shiraishi *et al.* (2002) estudiaron el estallido respiratorio (integral de quimioluminiscencia x  $10^5$  conteos  $\text{minuto}^{-1}$ ; como indicador de la producción de ERO) de neutrófilos aislados de *H. sapiens* y *T. truncatus* tras la exposición a diversas concentraciones de LPS de *E. coli* 026: B6. El estallido respiratorio, después de 30 minutos de incubación, fue aproximadamente 12.9, 20.4 y 9.0 veces más fuerte en los neutrófilos de *H. sapiens* en comparación con *T. truncatus* cuando se expusieron a 50, 250 y 500  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ , respectivamente (Shiraishi *et al.*, 2002). En estas condiciones, en los neutrófilos de *H. sapiens* aumentó la inducción del estallido respiratorio con cada concentración sucesiva de LPS, mientras que en los neutrófilos de *T. truncatus* disminuyó la inducción del estallido respiratorio a 250  $\mu\text{g de LPS mL}^{-1}$  y aumentó a 500  $\mu\text{g de LPS mL}^{-1}$  (Shiraishi *et al.*, 2002). Los autores sugieren que los neutrófilos de *T. truncatus* apenas pueden responder a estimulantes derivados de bacterias, como el LPS (Shiraishi *et al.*, 2002).

Zenteno-Savín *et al.* (2002) compararon los indicadores de estrés oxidativo en corazón, riñón y músculo de focas anilladas (*Phoca hispida*) y de cerdos (*Sus scrofa*). Los resultados sugieren que los tejidos de foca anillada tienen una mayor producción de  $O_2^{\cdot-}$  que los tejidos de cerdo bajo condiciones que simulan ciclos de isquemia y reperfusión (Zenteno-Savín *et al.* 2002).

Cantú-Medellín *et al.* (2011) analizaron la producción de ERO y las defensas antioxidantes en corazón, riñón, hígado, pulmón, cerebro y músculo de en *Tursiops truncatus*, *Kogia sima* y en *Kogia breviceps*. *T. truncatus* puede permanecer sumergido hasta ocho minutos y a profundidades hasta 535 m (Ridgway, 1986); *K. sima* puede bucear hasta 43 minutos (Breese y Tershy, 1993) a profundidades entre 525 y 3200 m (Baird, 2005); y *K. breviceps* puede sumergirse a profundidades entre 600 y 1200 m y hasta 18 minutos en duración (Scott *et al.*, 2001; West *et al.*, 2009). En ambas especies de *Kogia*, la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en todos los tejidos fue mayor en comparación con *T. truncatus* (Cantú-Medellín *et al.*, 2011). Los autores sugieren que estas diferencias están relacionadas a la capacidad de buceo (corto/superficial vs largo/profundo) de las especies estudiadas (Cantú-Medellín *et al.*, 2011).

### 2.3. Defensas antioxidantes en mamíferos terrestres y marinos

Ben-Shaul *et al.* (2001) analizaron la actividad de Mn-SOD en el precipitado de corazones homogenizados, y las actividades de Cu-Zn-SOD, CAT y GPx en el sobrenadante de corazones homogenizados de ratones Wistar (*Rattus norvegicus domestica*) 24 horas después de una exposición a 20 mg kg<sup>-1</sup> LPS de *E. coli* 055:B5 por medio de una inyección IP única (Ben-Shaul *et al.*, 2001). En comparación con los valores bajo condiciones control, la actividad de CAT, Mn-SOD y Cu-Zn-SOD fue significativamente mayor (por 20%) en animales expuestos a LPS (Ben-Shaul *et al.*, 2001). En contraste, la actividad de GPx no mostró cambios significativos entre los grupos (control vs. tratamiento con LPS) (Ben-Shaul *et al.*, 2001).

Wilhelm Filho *et al.* (2002) analizaron los niveles de antioxidantes en sangre de cinco especies de mamíferos buceadores incluyendo manatíes (*Trichechus manatus manatus*), elefantes marinos (*Mirounga leonina*), ballenas minke común (*Balaenoptera acutorostrata*), delfines rayados (*Stenella clymene*) y delfines franciscanos (*Pontoporia blainvillei*), así como cinco especies de mamíferos terrestres incluyendo una especie de mono (*Cebus apella*), hurón (*Grison vittatus*), mapache (*Procyon cancrivorous*), oso hormiguero (*Tamandua tetradactyla*) y venado (*Ozotocerus hesoarticus*). Los resultados sugieren que los mamíferos buceadores tienen una mayor capacidad antioxidante en comparación con los mamíferos que no bucean y, probablemente, que los mamíferos terrestres en general (Wilhelm Filho *et al.* 2002).

Reddy *et al.* (2006) cuantificaron las actividades de SOD, CAT, GPx, GR y GST en los testículos de *M. musculus* después de una inyección IP de 5 mg kg<sup>-1</sup> de LPS de *E. coli* 0127:B8 a 3, 6, 12, 24 y 72 horas después de la inyección. En comparación con los controles, a las 6 y 12 horas posteriores encontraron que la actividad de SOD disminuía por 49% y 40%, respectivamente; la actividad de CAT disminuyó por 53% y 57%, respectivamente; y la actividad de GPx disminuyó por 37% y 33%, respectivamente (Reddy *et al.*, 2006). Además, 12 y 24 horas después del tratamiento, la actividad de GR había disminuido por 41% y 37%, respectivamente; y la actividad de GST había disminuido por 40% y 29%, respectivamente (Reddy *et al.*, 2006). Se encontró que los cambios en la actividad enzimática eran insignificantes antes de las seis horas y después de 24 horas de tratamiento (Reddy *et al.*, 2006). Los autores sugieren que las disminuciones observadas en la actividad antioxidante pueden resultar de la inactivación de enzimas y el agotamiento de GSH debido a endotoxemia aguda (Reddy *et al.*, 2006).

Pine *et al.* (2007) analizaron la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y CAT en células epiteliales renales de *T. truncatus* (DKN<sub>1</sub>) y de *S. scrofa* (LLC-PK<sub>1</sub>). La actividad de CAT fue 1.5 veces menor y la actividad de GPx fue 10.5 veces menor en las células DKN<sub>1</sub> en comparación con las células LLC-PK<sub>1</sub> (Pine *et al.* 2007). Los autores sugieren que las diferencias entre los tipos de células podrían estar asociados a la edad (recién nacido o inmaduro) de las especies estudiadas, ya que se han reportado cambios en las defensas antioxidantes asociadas a la edad (Pine *et al.* 2007).

Zhu *et al.* (2007) analizaron las diferencias en las actividades de GPx, GR y GST en los cerebros en fetos de ratas Sprague-Dawley (*R. norvegicus domestica*), expuestas *in utero* a LPS de *E. coli* 026: B6 e individuos que fueron expuestos a LPS postparto. Para la exposición *in utero*, se administró una inyección IP con 10,000 unidades kg<sup>-1</sup> de LPS a hembras grávidas en el día 10.5 embrionario y se les permitió dar a luz (Zhu *et al.*, 2007). A un macho de cada camada se le extrajo el cerebro a los cuatro o 17 meses de edad y se analizaron el cuerpo estriado, el mesencéfalo, la corteza cerebral y el cerebelo (Zhu *et al.*, 2007). Para la exposición postnatal, se administró una inyección supranigral de 10 µg de LPS por 4 µL de solución salina a ratas (que no habían sido expuestas previamente a LPS) de cuatro meses de edad y se extrajo el cerebro medio para su análisis tres días después del tratamiento (Zhu *et al.*, 2007). En las ratas sometidas a exposición prenatal a LPS se observó mayor actividad de GPx, GST y GR en el cerebro en comparación con ratas que se inyectaron *in utero* con solución de salina (Zhu *et al.*, 2007). En los animales expuestos a LPS después del parto se observó una respuesta similar a las ratas que se inyectaron con LPS *in utero* en las actividades de GPx y GR en comparación con animales inyectados con solución salina; no se observaron cambios significativos en la actividad de GST (Zhu *et al.*, 2007).

Hritcu *et al.* (2011) estudiaron los cambios en las actividades enzimáticas de SOD y GPx en el cerebro de *M. musculus* sin exposición a LPS y después de la exposición a LPS. Los machos que pesaban aproximadamente 200 ± 50 g recibieron una inyección IP de LPS disuelto en solución salina a una dosis de 1 mL kg<sup>-1</sup> de peso corporal (Hritcu *et al.*, 2011). Los resultados indicaron que, en comparación con los valores bajo condiciones control, las actividades de SOD y GPx disminuyeron significativamente, de aproximadamente 0.15 y 0.24 unidades por miligramo de proteínas respectivamente, en los ratones que recibieron el tratamiento con LPS (Hritcu *et al.*, 2011).

Kanerva *et al.* (2012) estudiaron la actividad de SOD, CAT, GPx, GR y GST en muestras de hígado de *P. hispida* en áreas con elevada contaminación ambiental (el Mar Báltico) y con niveles de contaminación relativamente bajos (Svalbard, Noruega). Las actividades de SOD, CAT y GST no diferían entre las poblaciones, y tampoco se observaron diferencias por edad o sexo (Kanerva *et al.* 2012). En contraste, la actividad de GR y GPx fue significativamente más alta en focas muestreadas en el Mar Báltico (Kanerva *et al.* 2012). Los autores sugieren que las actividades de GR y GPx incrementan con las concentraciones de contaminantes hepáticos, aunque no se determinó ninguna otra relación entre la contaminación y los indicadores de estrés oxidativo (Kanerva *et al.* 2012).

#### **2.4. Daño oxidativo en respuesta a lipopolisacáridos en mamíferos terrestres y marinos**

Memon *et al.* (2000) administraron inyecciones IP a hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) machos con 100 µg de LPS de la cepa 55:B5 por cada 100 g de peso corporal para iniciar una infección sistémica aguda. Los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS; indicador de daño oxidativo a lípidos) en suero aumentaron 62% después de 24 horas y 83% después de 48 horas de la inyección con LPS (Memon *et al.* 2000). El estudio sugiere que el daño oxidativo a lípidos en suero depende de la dosis de LPS (Memon *et al.* 2000). Además, durante los procesos infecciosos, hay una mayor peroxidación de lípidos en las lipoproteínas de baja densidad (LDLs), moléculas que son altamente susceptibles a la oxidación (Memon *et al.* 2000).

Wilhelm Filho *et al.* (2002) analizaron las concentraciones de TBARS en la plasma de cinco especies de mamíferos buceadores incluyendo manatíes (*T. manatus manatus*), elefantes marinos (*M. leonina*), ballenas minke común (*B. acutorostrata*), delfines rayados (*S. clymene*) y delfines franciscanos (*P. blainvillei*), así como cinco especies de mamíferos terrestres incluyendo una especie de mono (*C. apella*), hurón (*G. vittatus*), mapache (*P. cancrivorous*), oso hormiguero (*T. tetradactyla*) y venado (*O. hesoarticus*). Los resultados sugieren que los mamíferos buceadores tienen menor daño oxidativo en la plasma en comparación con los mamíferos que no bucean (Wilhelm Filho *et al.* 2002).

Zenteno-Savín *et al.* (2002) analizaron las concentraciones de TBARS en los tejidos de *S. scrofa* y *P. hispida*. Encontraron que las concentraciones de TBARS fueron menores en *P. hispida* en

comparación con *S. scrofa*, probablemente debido a mayores niveles de antioxidantes en los tejidos de focas (Zenteno-Savín *et al.* 2002).

Reddy *et al.* (2006) administraron inyecciones IP a *M. musculus* machos adulto con  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  de LPS de *E. coli* O127:B8 para determinar las diferencias en las concentraciones de TBARS en los testículos durante las respuestas inflamatorias y no inflamatorias. Los ratones se sacrificaron a las 3, 6, 12, 24 y 72 horas después del tratamiento y los testículos se homogenizaron para su análisis (Reddy *et al.*, 2006). Los resultados indicaron que la concentración de TBARS fue significativamente mayor entre 6 y 24 horas después de la inyección, en comparación con las concentraciones bajo condiciones control, y la concentración máxima se observó a las 12 horas después de la inyección (Reddy *et al.*, 2006).

Melo *et al.* (2010) calcularon la producción de TBARS en *M. musculus* tolerantes e intolerantes a LPS usando LPS aislado de *E. coli* 026: B6. Los animales recibieron 1.0 mL de solución salina por medio de una inyección subcutánea (SC) durante cinco días o una inyección SC que contenía 0.5 o 1.0  $\text{mg kg}^{-1}$  de LPS (Melo *et al.*, 2010). Después de dos días posteriores a la inyección, los individuos recibieron una inyección IP que contenía 20 o 40  $\text{mg kg}^{-1}$  de LPS, se recolectaron muestras de sangre a 0, 2, 4, 6 y 8 horas después de la exposición y se cuantificaron los niveles de TBARS (Melo *et al.*, 2010). Se observó que las concentraciones de TBARS aumentan con el tiempo, aunque no hubo diferencias significativas en la concentración entre los grupos tolerantes e intolerantes, o la dosis de LPS administrada (Melo *et al.*, 2010).

Cantú-Medellín *et al.* (2011) analizaron la concentración de TBARS y carbonilos proteicos en corazón, riñón, hígado, pulmón, cerebro y músculo de *T. truncatus*, *K. sima*, y *K. breviceps*. Encontraron concentraciones mayores de TBARS en los tejidos de *T. truncatus* en comparación con *K. sima* y *K. breviceps*, pero no encontraron diferencias significativas en la concentración de carbonilos proteicos en los tejidos entre especies (Cantú-Medellín *et al.*, 2011).

Después de la incubación durante 1, 6 y 12 h, bajo condiciones control, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de carbonilos proteicos de los músculos oblicuos abdominales externos de *H. sapiens* y elefantes marinos del norte (*Mirounga angustirostris*), probablemente en relación con las defensas antioxidantes observadas entre especies (Del-Águila-Vargas *et al.*, 2019).

Hasta donde sabemos, no existen estudios que determinen el daño oxidativo en mamíferos marinos después de la exposición a LPS.

### 3. JUSTIFICACIÓN

¿Existen diferencias en los indicadores de estrés oxidativo en los leucocitos de mamíferos marinos y terrestres en respuesta a desafíos proinflamatorios?

Los mamíferos marinos y los mamíferos terrestres están sujetos a diversos desafíos fisiológicos en función de su estilo de vida y hábitat. Debido a que los mamíferos marinos han evolucionado a partir de los mamíferos terrestres, un análisis comparativo de los indicadores de estrés oxidativo entre grupos puede permitirnos comprender mejor los procesos de adaptación que han tenido lugar para que estos mamíferos prosperen en su entorno. A través del estudio de la respuesta inmune (activa e innata) basada en la activación de los leucocitos mediante las vías de señalización, se puede obtener una mejor comprensión de los mecanismos de defensa contra patógenos en mamíferos. Ello podría, eventualmente, llevar a tratamientos terapéuticos para afecciones patológicas asociadas al daño oxidativo. Además, hasta donde sabemos, este es el primer estudio para determinar la  $LC_{25}$  de LPS en los leucocitos de mamíferos marinos y existen pocos estudios que analicen los efectos de LPS en estos mamíferos.

#### **4. HIPOTESIS**

Las mayores defensas antioxidantes proporcionan a los tejidos de mamíferos marinos una protección adicional contra situaciones que propician estrés oxidativo, como la inflamación, en comparación con los tejidos de mamíferos terrestres.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Determinar si las mayores defensas antioxidantes de mamíferos marinos proporcionan a los leucocitos una protección adicional contra situaciones que propician estrés oxidativo, como la inflamación, en comparación con los leucocitos de mamíferos terrestres.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la concentración letal (LC<sub>25</sub>) de lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* bajo condiciones de cultivo celular,
2. Analizar la producción de radical superóxido en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a LPS bajo condiciones de cultivo celular,
3. Analizar las defensas antioxidantes en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a LPS bajo condiciones de cultivo celular,
4. Analizar el daño oxidativo en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a LPS bajo condiciones de cultivo celular.
5. Comparar los resultados entre tratamientos (control vs exposición a LPS) y entre especies (*Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli*).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

A menos que se especifique lo contrario, todas las soluciones se prepararon utilizando productos obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.).

### 6.1. Colecta de muestras de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli*

Se colectaron muestras de sangre (8-15 mL) de 19 delfines nariz de botella, también conocidos como tursiones, del Pacífico de ambos sexos bajo el cuidado de Cabo Dolphins, Cabo San Lucas, Baja California Sur, México. Los tursiones tenían entre 1 y 30 años. Todas las muestras fueron colectadas por los veterinarios del delfinario, siguiendo los protocolos desarrollados para monitorear la salud de los tursiones. Todas las muestras fueron colectadas sin ningún tipo de restricción y después de un período de ayuno de 12 a 13 horas. La sangre se tomó de la vena caudal usando una aguja de mariposa estéril 21G x 3/4" x 12" (BD Vacutainer Safety-Lok, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Antes de la punción venosa, la piel se limpió con alcohol (70%) y yodo (5%). Las muestras se transfirieron a tubos de plástico que contenían ácido etilendiaminotetraacético dipotásico (EDTA- K<sub>2</sub>) como anticoagulante (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.); se colocaron en una hielera y se transportaron sobre hielo al Laboratorio de Estrés Oxidativo de CIBNOR, donde se almacenaron durante la noche en refrigeración a 4°C.

Con la aprobación del Comité de Ética en Investigación (CONBIOÉTICA-09-CEI- 009-20160601; número de registro 2018-785-010), se obtuvieron 29 muestras de sangre (20 mL) de mujeres y hombres de entre 18 y 65 años, quienes acudieron, en ayunas (entre 4 y 8 horas), como donantes anónimos al banco de sangre; todas las muestras se colectaron por técnicos certificados en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en La Paz, Baja California Sur, México. La información de los donantes, incluidos el nombre, el sexo y la edad, se mantuvo en el anonimato.

Las muestras de sangre se tomaron del brazo de los donantes después de limpiar la zona con alcohol al 70%. Los requisitos para ser susceptible a donación incluyen que las personas deban estar libres de enfermedades e infecciones; tener un peso mayor de 50 kilogramos; no haber ingerido bebidas alcohólicas en las últimas 72 horas; no haber tomado medicamentos en los últimos cinco días; no haberse vacunado en los últimos 30 días; no haber sido operado en los últimos 6 meses; y no haberse practicado tatuajes o perforaciones (incluyendo tratamientos de

endodoncia o acupuntura) en los últimos 12 meses. Para este proyecto, se obtuvo sangre entera residual; las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su transporte al Laboratorio de Estrés Oxidativo de CIBNOR, donde se almacenaron durante la noche en refrigeración a 4°C.

## **6.2. Aislamiento de leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli***

Para aislar los leucocitos de cada muestra de ambas especies, se mezcló la sangre completa en una proporción de 1:1 con solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Gibco, Paisley, Reino Unido) o solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (PBS; Gibco, Paisley, Reino Unido), según disponibilidad, en un tubo de centrifugación Nest (Fisher Scientific, New Hampshire, EE. UU.). Después de mezclar suavemente, la solución se pipeteó cuidadosamente a un tubo que contenía Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, SE) en una proporción de sangre a Ficoll de 1:2. Los tubos se centrifugaron (Legend RT, Sorvall, Kendro Laboratory Products, DE) durante 25 minutos a 650  $\times$  g y 25°C. La capa de leucocitos resultante se aisló y se colocó en un tubo de centrifugación Nest, y se lavó con PBS o HBSS. Los contenidos se mezclaron completamente y, posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 350  $\times$  g y a 25°C. Se descartó el sobrenadante, y el paquete de leucocitos se enjuagó por segunda vez con PBS o HBSS bajo las condiciones descritas anteriormente. En las situaciones en las que el paquete celular contenía una gran cantidad de eritrocitos, se hizo un tercer lavado con PBS/HBSS; se tomaron todas las precauciones debidas para evitar la lisis de los leucocitos.

Posteriormente al último lavado, se retiró el sobrenadante y al paquete de leucocitos se le agregó medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA, St. Louis, MO, EE. UU.), que contenía estreptomycin/penicilina al 1% (Gibco, Paisley, Reino Unido) y suero fetal bovino al 10% (Gibco, Paisley, Reino Unido).

## **6.3. Viabilidad y concentración letal en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

El análisis de la viabilidad celular se realizó con base en los métodos de Colotta *et al.* (1992). Se prepararon diluciones del paquete leucocitario en PBS o HBSS con el objetivo de contar menos de 60 células por campo, para mejorar la precisión del conteo. Se agregó colorante azul de tripano (0.4%) filtrado (Gibco, Paisley, Reino Unido) para visualizar células muertas y las

diluciones se dejaron sin perturbar durante cinco minutos. Se realizó el conteo de los leucocitos, registrando el número de células vivas y de células muertas en cada muestra por triplicado, utilizando un hemocitómetro de línea brillante (Hausser Scientific, Horsham, PA, EE. UU.) y un microscopio (Scope A1, Zeiss, Oberkochen, Alemania) con lente objetivo 10x/0.25 (N-Achroplan, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Se obtuvo el número total de células en cada muestra usando la siguiente fórmula.

$$\text{Conteo celular total} = \text{conteo celular promedio} \times \text{factor(es) de dilución} \times 10\,000 \quad (1)$$

Después del conteo total inicial de células, se colocaron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células (1 mL) en un frasco de cultivo celular. Los leucocitos se expusieron, por duplicado, al medio de cultivo celular como control ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o a LPS de *Escherichia coli* cepa O55:B5 (028M4138V, SIGMA, St. Louis, MO, EE. UU.), preparado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los leucocitos de humanos fueron expuestos a LPS en concentraciones de 0, 2, 3, 5, 7 y  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  ( $n = 11$ ). Los leucocitos de delfín se expusieron a 0, 3, 5, 7 y  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  ( $n = 7$ ). Después de una mezcla suave, los frascos de cultivo celular se incubaron (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 a 48 horas. Del resto de la mezcla original de leucocitos (0 horas), se colocaron  $100 \mu\text{L}$  de cada muestra en un tubo y se agregaron  $900 \mu\text{L}$  de PBS. Con esta mezcla, se realizó un conteo diferencial de células utilizando un citómetro (Coulter LH 780, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), en los laboratorios del IMSS.

Después de 24 y 48 horas de incubación, se retiraron  $130 \mu\text{L}$  de cada frasco de cultivo celular y se colocaron dentro de un tubo eppendorf. De esta solución, se usaron  $30 \mu\text{L}$  para crear diluciones para conteos de células totales, en ambas especies, con el microscopio, y se mezclaron  $100 \mu\text{L}$  con  $900 \mu\text{L}$  de PBS para conteos mecánicos en el IMSS. Los conteos de células totales se realizaron por triplicado utilizando las soluciones y el equipo antes mencionados. A partir del promedio de estos conteos, se determinó el porcentaje (%) de mortalidad para cada individuo y cada concentración de LPS en *H. sapiens* y *T. truncatus gilli*. Para calcular la  $\text{LC}_{50}$  se graficó la concentración de LPS (abcisas) contra el porcentaje de mortalidad (ordenadas) y se utilizó un análisis probit mediante la tabla interactiva de Finney (1952).

#### **6.4. Conteo diferencial de leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli***

Inicialmente, se realizaron conteos diferenciales de leucocitos (control, 0 horas) en sangre completa de *Homo sapiens* (n = 10) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12), con base en los métodos de Zaias *et al.* (2017) y en leucocitos a las 24 y 48 horas posteriores al cultivo celular con LPS (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o sin LPS. Para ello, de cada frasco de cultivo celular se tomó 1 mL y se colocaron en tubos eppendorf (Neptune Scientific, San Diego, CA, EE. UU.) etiquetados, y se centrifugaron (eppendorf, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Sorvall, Reino Unido) durante 5 minutos a  $360 \times g$  a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se eliminaron 900  $\mu\text{L}$  de sobrenadante; el precipitado de leucocitos se resuspendió mezclándolo suavemente con una pipeta. Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento y se usaron para crear frotis individuales. Cada portaobjetos se dejó secar sin perturbar entre 20 y 30 minutos. Una vez seca, cada muestra de leucocitos se tiñó con hemocolorante (HYCEL, Zapopan, Jal, México), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se dejó secar durante 20 a 30 minutos adicionales. Cada laminilla se leyó individualmente usando un lente de inmersión en aceite 100XA/1.25 (Nikon, Melville, NY, EE. UU.), y un microscopio (Nikon Eclipse Ni, Melville, NY, EE. UU.). El conteo diferencial de leucocitos se obtuvo leyendo el portaobjetos de lado a lado en un movimiento en zig-zag, registrando el número de cada tipo de leucocitos presente hasta que se contaron 100 células en total; se registró también el tamaño relativo ( $\leq 10 \mu\text{m}$  o  $> 10 \mu\text{m}$ ) de cada tipo de célula y se obtuvieron registros fotográficos (Nikon Digital Sight DS-Fi2, Melville, NY, EE. UU.), utilizando el software NIS-Elements AR ([https://www.nikon.com/products/microscope-solutions/support/download/software/imgsfw/nis-ar\\_v43001du164.htm](https://www.nikon.com/products/microscope-solutions/support/download/software/imgsfw/nis-ar_v43001du164.htm)).

#### **6.5. Exposición de leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* a lipopolisacáridos**

El conteo celular total obtenido inicialmente (sección 6.4), se usó para determinar el volumen necesario para tener aproximadamente  $1 \times 10^6$  leucocitos en cada frasco de cultivo celular (Corning, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU.), con un volumen total de 1 mL. Los frascos se asignaron aleatoriamente al tratamiento control sin LPS (medio de cultivo sin LPS) o al tratamiento experimental (medio de cultivo con  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ). Cada frasco de cultivo celular se mantuvo en una incubadora, a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas o 48 horas, en duplicado. Al finalizar el tiempo de exposición, se hizo el conteo total y diferencial de leucocitos, como se explicó anteriormente (sección 6.3 y 6.4), en una alícuota de cada frasco. El volumen

restante se centrifugó a  $360 \times g$  durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de PBS a cada paquete de células para obtener una solución homogénea. Se colocaron 800  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento en viales criogénicos (Corning Incorporated, Corning, NY, EE. UU.), etiquetados apropiadamente y se mantuvieron en congelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) hasta su análisis; el sobrenadante se almacenó en alícuotas de 1.5 mL a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.6. Producción de radical superóxido en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

Usando los métodos de Markert *et al.* (1984) y Drossos *et al.* (1995) adaptados a microplaca (placa de ensayo Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, EE. UU.), la tasa de producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se calculó utilizando un método colorimétrico indirecto y discontinuo, basado en la reducción del ferricitocromo c en un intervalo de tiempo fijo. A cada muestra, se le agregó amortiguador de Krebs (cloruro de sodio (118 mM), cloruro de potasio (4.7 mM), sulfato de magnesio (12 mM), fosfato de sodio monobásico (13.83 mM), carbonato de sodio (1.9 mM), glucosa (0.2%), agua destilada) y se mezcló al vortex (VWR Scientific, Radnor, PA, EE. UU.). Se agregó citocromo C (15  $\mu\text{M}$ ) a cada muestra y se mezcló con el vortex para iniciar la reacción. Las muestras se colocaron en un baño de agua (Polyscience, Niles, IL, EE. UU.), a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, después de lo cual se retiraron, se colocaron en agua con hielo y se añadió N-etilmaleimida (3 mM) para terminar la reacción. Las muestras se mezclaron con el vortex y se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos a  $500 \times g$ . Después de centrifugar, se transfirieron 250  $\mu\text{L}$  de cada muestra a una microplaca y se leyó la absorbancia a 550 nm. Para cada muestra se preparó un blanco; para ello, se descartó el sobrenadante restante de los tubos eppendorf centrifugados y se añadió buffer de Krebs, N-etilmaleimida y citocromo C al precipitado y se mezcló usando el vortex. Cada tubo eppendorf se incubó y centrifugó en las condiciones descritas anteriormente y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 550 nm. El cambio en la absorbancia a 550 nm se usó para determinar la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Los resultados se expresan en nanomoles de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por miligramo de proteína por minuto.

### **6.7. Defensas antioxidantes en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

Previo al análisis para cuantificar los indicadores de estrés oxidativo (actividad de enzimas antioxidantes, TBARS y carbonilos proteicos), a cada muestra se le agregó solución para homogenizar (50 mM) y PMSF (1 mM).

La actividad de superóxido dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1) se determinó siguiendo el método de Suzuki (2000) adaptado a microplaca. El  $O_2^{\cdot-}$  producido a partir de la interacción entre xantina y xantina oxidasa, reacciona con nitroazul de tetrazolio (NBT) y se produce un compuesto reducido llamado formazán. Se detectan cambios en la absorbancia cuando la SOD inhibe la producción de formazán. Cada muestra (10  $\mu$ L) se transfirió a una microplaca y se mezcló con solución de trabajo (solución amortiguadora de carbonato de sodio (50 mM), xantina (100  $\mu$ M), NBT (0.25 mM), EDTA (1 mM) y XO (0.1 unidades)) usando una pipeta multicanal (Finnpipette, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.); se prepararon blancos reemplazando la muestra con solución de trabajo. La microplaca se colocó inmediatamente en el lector de microplacas, y se registró la absorbancia a 240 nm cada minuto durante cinco minutos. La actividad de SOD se presenta en unidades (U) por miligramo de proteína. Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% de la reacción entre  $O_2^{\cdot-}$  y NBT.

La actividad catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.6) se determinó siguiendo el método de Aebi (1984) midiendo el decremento en la concentración de  $H_2O_2$ . En cuvetas de cristal (VWR Spectrophotometry Cell, Radnor, PA, EE. UU.), se mezclaron 10  $\mu$ L de cada dilución, por triplicado, con 1.5 mL de solución de trabajo (buffer de fosfato 0.1 M,  $H_2O_2$  20 mM). La absorbancia de cada muestra se leyó a 240 nm, usando un espectrofotómetro (DU 800, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.), cada 15 segundos durante 180 segundos. La actividad de CAT se expresa como unidades por miligramo de proteína. Una unidad de actividad se define como la cantidad de CAT necesaria para reducir 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  por minuto.

La actividad de glutatión peroxidasa (GPx; E.C. 1.11.1.9) se determinó según el método, adaptado para microplaca, de Flohé y Günzler (1984). La reacción está basada en la disminución del NADPH al mantener constantes los niveles de GSH. Se mezclaron 10  $\mu$ L de muestra, amortiguador de fosfato de potasio (500 mM), EDTA (50 mM), azida de sodio (20 mM), GR (15

U mL<sup>-1</sup>), NADPH (1.5 mM), GSH (250 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en pozos de una microplaca. Se preparó un blanco sustituyendo la muestra por solución amortiguadora. Se registró la absorbancia a 340 nm cada minuto durante cinco minutos. La actividad de GPx se expresa en unidades por miligramo de proteína. Una unidad de actividad se define como la cantidad de GPx necesaria para causar la oxidación de 1.0 μmol de GSH para formar GSSG por minuto. La actividad de glutatión reductasa (GR; E.C. 1.8.1.7.) se determinó mediante la oxidación de NADPH, lo que resulta en una disminución de la absorbancia a 340 nm, utilizando el método adaptado para microplaca de Goldberg y Spooner (1987). Se añadieron 10 μL de muestra, amortiguador de fosfato de potasio (500 mM), EDTA (50 mM), NADPH (2 mM) y GSSG (10 mM) a pozos de una microplaca. Se preparó un blanco sustituyendo la muestra por solución amortiguadora. El cambio en la absorbancia a 340 nm se registró cada minuto durante cinco minutos. La actividad de GR se expresa en unidades por miligramo de proteína. Una unidad de actividad se define como la cantidad de GR necesaria para reducir 1.0 μmol de GSSG a GSH por minuto.

La actividad de glutatión S-transferasa (GST; E.C. 4.4.1.34.) se determinó en un lector de microplaca a 340 nm en función de la concentración de tioéter glutatión dinitrobenceno, como producto de la unión del GSH con 1-cloro 2, 4-dinitrobenceno (CDNB), con base en el método descrito por Habig y Jakoby (1981). Se añadieron 10 μL de muestra, solución amortiguadora de fosfato (0.1 M), GSH (10 mM), EDTA (60 mM) y CDBN (10 mM). El cambio en la absorbancia a 340 nm registró cada minuto durante cinco minutos. La actividad de GST se expresa en unidades por miligramo de proteína. Una unidad de actividad se define como la cantidad de GST necesaria para catalizar la conjugación de 1 μmol de CDBN por minuto.

### **6.8. Daño oxidativo en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

El daño oxidativo a lípidos se midió cuantificando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando los métodos modificados de Persky *et al.* (2000). Se prepararon diluciones de 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano (TEP) para construir una curva estándar (0 a 5 nmol 50 mL<sup>-1</sup>). Las muestras se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Después de la incubación, todos los tubos se colocaron en agua con hielo. Se agregó ácido tricloroacético (TCA, ácido clorhídrico (1.0 mol L<sup>-1</sup>)) al 20% y ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1% a cada tubo y se mezclaron



en vortex. Se llevó a cabo una segunda incubación durante 10 minutos en baño de agua (Precision, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 90°C; posteriormente, todos los tubos se colocaron en agua con hielo, se secaron y se centrifugaron durante 15 minutos a 1500  $x g$  a 4°C. Aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  de cada tubo se transfirieron a una microplaca y la absorbancia se leyó una vez entre 532-535 nm. A partir de la curva estándar y usando la ecuación para línea recta  $y = mx + b$  (donde  $x$  = concentración de TEP,  $y$  = absorbancia promedio), se determinó la concentración de TBARS en cada muestra. Los resultados se expresan en nmoles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por miligramo de proteína.

El daño oxidativo a proteínas se midió utilizando los métodos modificados de Levine *et al.* (1990). A cada muestra se le añadió 1 mL de ácido sulfosalicílico al 5%, los tubos se mezclaron usando un vortex y los contenidos se dividieron en cuatro partes iguales. Dos tubos se trataron como "muestra", mientras que los otros dos se trataron como "blancos". Los tubos se centrifugaron a 350  $x g$  durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se tomaron 240  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y a cada uno de los tubos "muestra" se agregó dinitrofenil hidrazina (DNPH; 10 mM), mientras que a los "blancos" se agregó ácido hidrocórico (HCl; 2.5 M; Fermont, Monterrey, SA, MX.). Los tubos se protegieron de la luz y se mezclaron con vortex por 5 segundos cada 15 minutos durante una hora. Una vez terminado el período, se agregó TCA al 20% a cada tubo, se incubaron en agua fría durante 10 minutos y se centrifugaron a 350  $x g$  durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y la solución restante se lavó con etanol: acetato de etilo (1:1; J. T. Baker, Phillipsburg, N. J., EE. UU.). Los tubos se centrifugaron utilizando las condiciones descritas anteriormente y se les añadió clorato de guanidina (6 M), se mezclaron con vortex y se incubaron en baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugaron una vez más, se colocaron los sobrenadantes en pozos de microplaca y se leyó la absorbancia de las muestras y los blancos a 340 y 405 nm. Se registró la absorbancia máxima y se utilizó la diferencia entre promedios de cada muestra para calcular la concentración de carbonilos proteicos. La concentración de carbonilos proteicos se expresa en micromoles por miligramo de proteína.

### **6.9. Proteínas totales en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

Para estandarizar los resultados, se cuantificó la cantidad de proteínas solubles en cada muestra con base en el método descrito por Bradford (1976) adaptado para microplaca y usando albúmina bovina como estándar. A partir de una solución de albúmina en agua destilada, se preparó una curva estándar en diluciones de 0.005 a 0.2 mg mL<sup>-1</sup>. Las muestras fueron diluidas 1:20 con solución de homogenización (amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.5, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 60 mM, Fermont, Monterrey, SA, MX.) (50 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; 1 mM); posteriormente, se diluyeron a 1:50 con agua destilada. Se añadieron 155 µL de agua destilada, 45 µL de colorante azul de Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y 25 µL de muestra o estándar a cada pozo de la microplaca. Se mezcló con vortex y se dejó reaccionar durante 15 minutos, después de lo cual se leyó la absorbancia a 590 nm usando un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). A partir de la curva estándar y usando la ecuación para línea recta  $y = mx + b$  (donde  $x$  = concentración de albúmina,  $y$  = absorbancia promedio), se determinó la concentración de proteínas solubles en cada muestra. La concentración de proteínas totales se expresa en microgramos por mililitro.

### **6.10. Análisis estadístico**

En los casos en los que los datos resultantes estaban fuera del rango de detección de la metodología respectiva, se aplicó un factor de corrección (Helsel, 1990). Para analizar la normalidad y homogeneidad de la varianza en la base de datos, se aplicaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente (Zar, 1999; Garson, 2012). Para determinar si había diferencias significativas en los conteos diferenciales y los indicadores de estrés oxidativo entre *H. sapiens* y *T. truncatus gilli*, así como entre sexos y estadios de madurez en *T. truncatus gilli*, se utilizó la prueba T para muestras independientes (Zar, 1999). En estas mismas condiciones, para determinar si había diferencias significativas en los conteos diferenciales y los indicadores de estrés oxidativo en la misma especie, y para *T. truncatus gilli* en el mismo sexo o estadio de madurez, se utilizó la prueba T para muestras dependientes (Zar, 1999). Cuando los datos no se ajustaron a la distribución normal o que tuvieron varianzas iguales, para determinar si había diferencias significativas en los conteos diferenciales y los indicadores de estrés oxidativo entre *H. sapiens* y *T. truncatus gilli*, así como entre sexos y estadios de madurez en *T. truncatus*

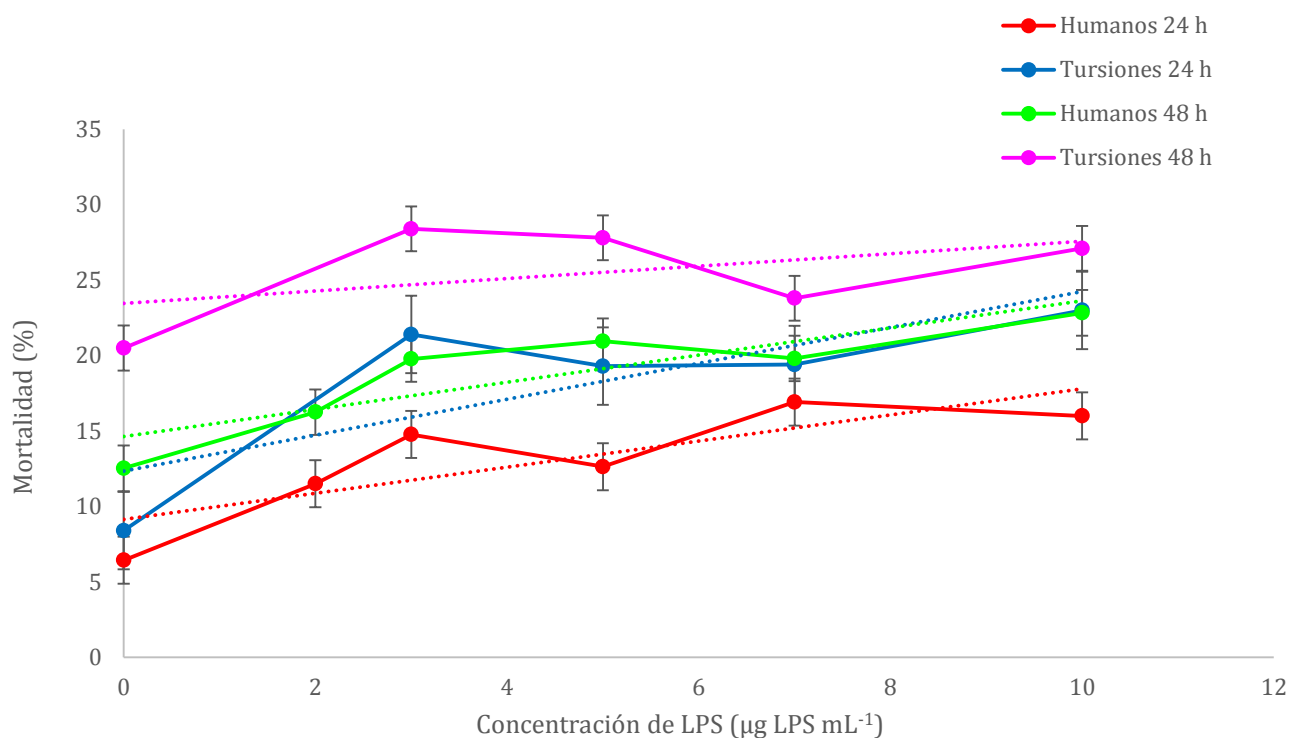
*gilli*, se aplicó la prueba no-paramétrica de Mann Whitney (Zar, 1999). En estas mismas condiciones, para determinar si había diferencias significativas en los conteos diferenciales y los indicadores de estrés oxidativo en la misma especie, y para *T. truncatus gilli* en el mismo sexo o estadio de madurez, se utilizó la prueba Wilcoxon de dos muestras relacionadas (Zar, 1999).

Todos los análisis se realizaron con el paquete IBM SPSS Statistics Viewer y la significancia estadística se estableció a  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Viabilidad celular y concentración letal en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos

Se presentan los resultados de viabilidad celular para los leucocitos de humanos y tursiones expuestos a diferentes concentraciones de LPS en la **Tabla I** y la **Fig. 4**. Con base en el análisis gráfico de la mortalidad promedio de leucocitos (%), se determinó que la mortalidad más alta en *H. sapiens* ocurrió en  $7 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a 24 h y en  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a 48 h. Con base en el análisis gráfico de la mortalidad promedio de leucocitos (%), se determinó que la mortalidad más alta en *T. truncatus gilli* ocurrió en  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a 24 h y  $3 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a 48 h.



**Figura 4.** Relación entre la concentración de lipopolisacáridos (LPS,  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) y la mortalidad (%) de leucocitos en *Homo sapiens* ( $n = 11$ ) y *Tursiops truncatus gilli* ( $n = 7$ ) después de 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar.

Para los datos de *H. sapiens*, después del análisis gráfico, se determinó que existía una ligera relación lineal entre la concentración de LPS, y la viabilidad (mortalidad) de leucocitos a las 24 y 48 h. Usando los datos naturales de la concentración de LPS, la  $LC_{50}$  se calculó en *H. sapiens* como  $47.18 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a las 24 horas y como  $39.32 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a las 48 horas. En *T. truncatus gilli*, de acuerdo con el análisis gráfico, la relación entre la concentración de LPS, y la viabilidad (mortalidad) fue ligeramente lineal a las 24 h y no fue lineal a las 48 h de incubación. Usando los datos naturales de la concentración de LPS, la  $LC_{50}$  se calculó en *T. truncatus gilli* como  $31.64 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a las 24 horas.

Para el cálculo de la  $LC_{50}$  se transformaron los datos de viabilidad celular (expresada en % de mortalidad) a logaritmo base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) de la concentración de LPS. En los datos de *H. sapiens*, de acuerdo con el análisis gráfico de los datos transformados, se evidenció una relación lineal después de 24 y 48 horas de exposición. La  $LC_{50}$  en *H. sapiens* a las 24 horas se calculó como 4.5, que corresponde a  $31,622 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ , y a las 48 horas, se calculó como 3.76, correspondiente a  $5,754 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ . No se pudo calcular la  $LC_{50}$  a las 48 horas con la concentración natural de LPS. No se pudo calcular la  $LC_{50}$  a las 24 o 48 horas usando la concentración de LPS transformada a  $\text{Log}_{10}$  en *T. truncatus gilli* porque no existía una relación lineal.

**Tabla I.** Concentración letal media (LC<sub>50</sub>) de lipopolisacáridos (LPS) en *Homo sapiens* (n = 11) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 7) calculada con la ecuación de la recta de mortalidad celular, la concentración natural y la concentración logaritmo base 10 (LOG<sub>10</sub> concentración) de LPS.

Especie	Método	Tiempo de Incubación (h)	Ecuación de la Recta	Valor R <sup>2</sup>	Concentración Letal Media (LC <sub>50</sub> ) (µg LPS mL <sup>-1</sup> )
<i>Homo sapiens</i>	Concentración Natural	24	$y = 0.866x + 9.1455$	0.6738	47.18
	LOG <sub>10</sub> Concentración	24	$y = 9.3343x + 7.9398$	0.7856	31 622
	Concentración Natural	48	$y = 0.8991x + 14.645$	0.7721	39.32
	LOG <sub>10</sub> Concentración	48	$y = 9.7426x + 13.365$	0.9099	5 754
<i>Tursiops truncatus gilli</i>	Concentración Natural	24	$y = 1.1897x + 12.352$	0.6222	31.64
	LOG <sub>10</sub> Concentración	24	$y = 13.5x + 10.2$	0.5608	*NC
	Concentración Natural	48	$y = 0.4103x + 23.468$	0.2212	*NC
	LOG <sub>10</sub> Concentración	48	$y = 5.5862x + 22.168$	0.1675	*NC

\* NC: No calculado

Con base en las discrepancias en los valores estimados de  $LC_{50}$  en *H. sapiens* y la incapacidad para estimar el  $LC_{50}$  en *T. truncatus gilli*, se decidió calcular la  $LC_{25}$  utilizando el análisis probit (**Tabla II**). La  $LC_{25}$  para *T. truncatus gilli* ( $n = 5$ ) fue de  $14.114 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a 48 horas, mientras que la  $LC_{25}$  para *H. sapiens* ( $n = 7$ ) fue de  $6.968 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  a 48 horas. Entre estos valores se calculó una concentración promedio aproximada de  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  de LPS, que se utilizó en los bioensayos posteriores para ambas especies.

**Tabla II.** Valores estimados de las concentraciones de lipopolisacáridos ( $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) aislados de *Escherichia coli*, que causan la mortalidad con porcentajes (%) variables de leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli*, después de 48 horas de incubación.

Concentración Letal (% Mortalidad)	Concentración Letal ( $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) en <i>Tursiops truncatus gilli</i>	Intervalo de Confianza Fiducial (95%) en <i>Tursiops truncatus gilli</i>		Concentración Letal ( $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) en <i>Homo sapiens</i>	Intervalo de Confianza Fiducial (95%) en <i>Homo sapiens</i>	
		Inferior	Superior		Inferior	Superior
20	8.140	1.400	47.315	4.501	1.104	18.341
21	9.140	1.572	53.130	4.935	1.211	20.110
22	10.231	1.760	59.469	5.397	1.324	21.993
23	11.418	1.964	66.372	5.888	1.445	23.997
24	12.710	2.187	73.881	6.412	1.573	26.129
25	14.114	2.428	82.041	6.968	1.710	28.397
26	15.638	2.690	90.902	7.559	1.855	30.806
27	17.292	2.975	100.517	8.188	2.009	33.367
28	19.086	3.284	110.944	8.855	2.173	36.088
29	21.031	3.618	122.246	9.565	2.347	38.979
30	23.137	3.980	134.489	10.318	2.532	42.048



## 7.2. Conteo diferencial de leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos

Los resultados de la identificación y conteo de los diferentes tipos de leucocitos en muestras de *H. sapiens* (n = 10) y *T. truncatus gilli* (n = 12) se presentan en la **Tabla IA** y la **Fig. 5**. En ausencia de LPS a las cero horas, en las muestras de *T. truncatus gilli* se observaron más eosinófilos en comparación con *H. sapiens* (1.6 veces, p = 0.01). En ausencia de LPS a las 48 h, se observaron más neutrófilos en *T. truncatus gilli* en comparación con *H. sapiens* (38.7 veces, p = 0.028). En presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>), a las 24 h, se observaron más monocitos en *H. sapiens* en comparación con *T. truncatus gilli* (no se observaron monocitos; p = 0.046). En presencia de LPS a las 48 h, se observaron más eosinófilos en *H. sapiens* en comparación con *T. truncatus gilli* (2.4 veces, p = 0.001). Debido a que se observó que sólo un individuo de *T. truncatus gilli* tenía una célula compatible con la morfología correspondiente a basófilos, tanto en condiciones basales (a 0 h en ausencia de LPS) como en todos los tratamientos, *H. sapiens* presentó significativamente más basófilos en comparación con *T. truncatus gilli* en ausencia de LPS en el tiempo 0 h (p = 0.02), a 24 h (p = 0.002), a 48 h (p = 0.00) y en presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) a 24 h (p = 0.47) y 48 h (p = 0.019).

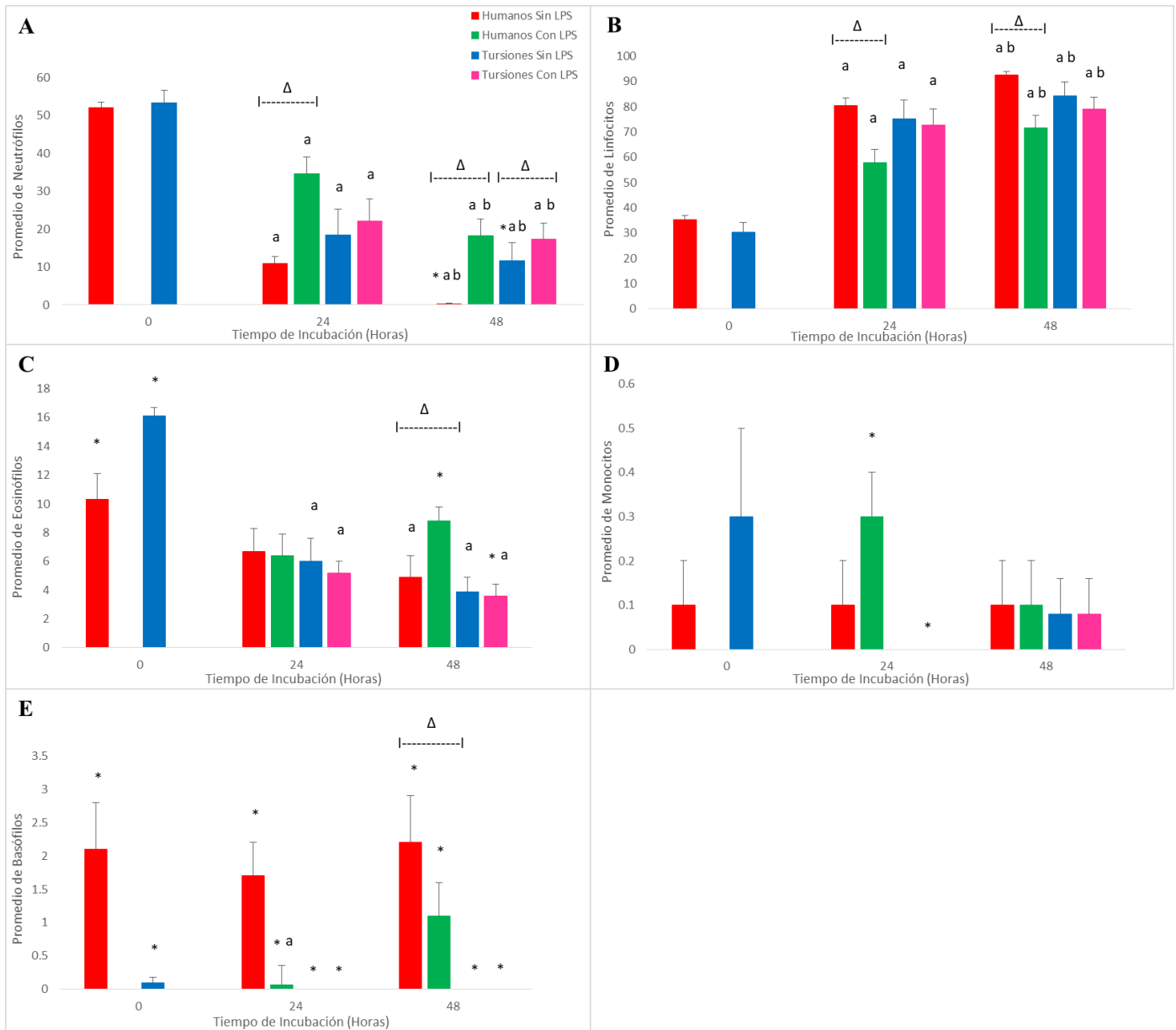
Los resultados de la identificación y conteo intraespecífico de los diferentes tipos de leucocitos en muestras de *H. sapiens* y *T. truncatus gilli* se presentan en la **Tabla IA** y la **Fig. 5**. Se observaron más neutrófilos en muestras de *T. truncatus gilli* expuestas a LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) en comparación con aquellas en ausencia de LPS (1.5 veces, p = 0.05). En muestras de *H. sapiens* en ausencia de LPS a las 24 h, se observaron menos neutrófilos y más linfocitos en comparación con las muestras en presencia de LPS (3.2 veces, p = 0.007; 1.4 veces, p = 0.007, respectivamente). En muestras de *H. sapiens* en ausencia de LPS a las 48 h, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos, menos eosinófilos y más basófilos en comparación con aquellas expuestas a LPS (61 veces, p = 0.007; 1.3 veces, p = 0.005; 1.8 veces, p = 0.011; 2.0 veces, p = 0.039, respectivamente).

Los resultados de la identificación y conteo de los diferentes tipos de leucocitos entre tiempos de incubación en muestras de *H. sapiens* y *T. truncatus gilli* se presentan en la **Tabla IA** y la **Fig. 5**. En muestras de *H. sapiens* en ausencia de LPS a las 0 h, se observaron más neutrófilos y menos linfocitos en comparación con las 24 h (4.8 veces, p = 0.005; 2.3 veces, p = 0.005, respectivamente). En muestras de *H. sapiens* en presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) a las 24 h, se observaron menos neutrófilos, más

linfocitos y menos basófilos en comparación con 0 h (ausencia de LPS) (1.5 veces,  $p = 0.036$ ; 1.6 veces,  $p = 0.005$ ; 3.5 veces,  $p = 0.044$ , respectivamente). En muestras de *H. sapiens* en ausencia de LPS a las 48 h, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con 0 h (ausencia de LPS) (174 veces,  $p = 0.005$ ; 2.6 veces,  $p = 0.005$ ; 1.0 veces,  $p = 0.008$ , respectivamente). En muestras de *H. sapiens* en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a las 48 h, se observaron menos neutrófilos y más linfocitos en comparación con 0 h (ausencia de LPS) (2.8 veces,  $p = 0.005$ ; 2.0 veces,  $p = 0.005$ , respectivamente). En muestras de *H. sapiens* en ausencia de LPS a 24 h, se observaron más neutrófilos y menos linfocitos en comparación con las 48 h (36.3 veces,  $p = 0.005$ ; 1.1 veces,  $p = 0.008$ , respectivamente). En muestras de *H. sapiens* en presencia de LPS a 24 h, se observaron más neutrófilos y menos linfocitos en comparación con las 48 h (1.9 veces,  $p = 0.005$ ; 1.2 veces,  $p = 0.005$ , respectivamente).

En muestras de *T. truncatus gilli* en ausencia de LPS a las 24 h de incubación, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con 0 h (ausencia de LPS) (2.9 veces,  $p = 0.002$ ; 2.5 veces,  $p = 0.002$ ; 6.0 veces,  $p = 0.002$ , respectivamente). En muestras de *T. truncatus gilli* en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a las 24 h, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con 0 h (ausencia de LPS) (2.4 veces,  $p = 0.002$ ; 2.4 veces,  $p = 0.002$ ; 2.0 veces,  $p = 0.002$ , respectivamente). En muestras de *T. truncatus gilli* en ausencia de LPS a las 48 h de incubación, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con 0 h (ausencia de LPS) (4.6 veces,  $p = 0.002$ ; 2.8 veces,  $p = 0.002$ ; 4.1 veces,  $p = 0.002$ , respectivamente). En muestras de *T. truncatus gilli* en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a las 48 h, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con 0 h (ausencia de LPS) (3.1 veces,  $p = 0.002$ ; 2.6 veces,  $p = 0.002$ ; 4.5 veces,  $p = 0.002$ , respectivamente).

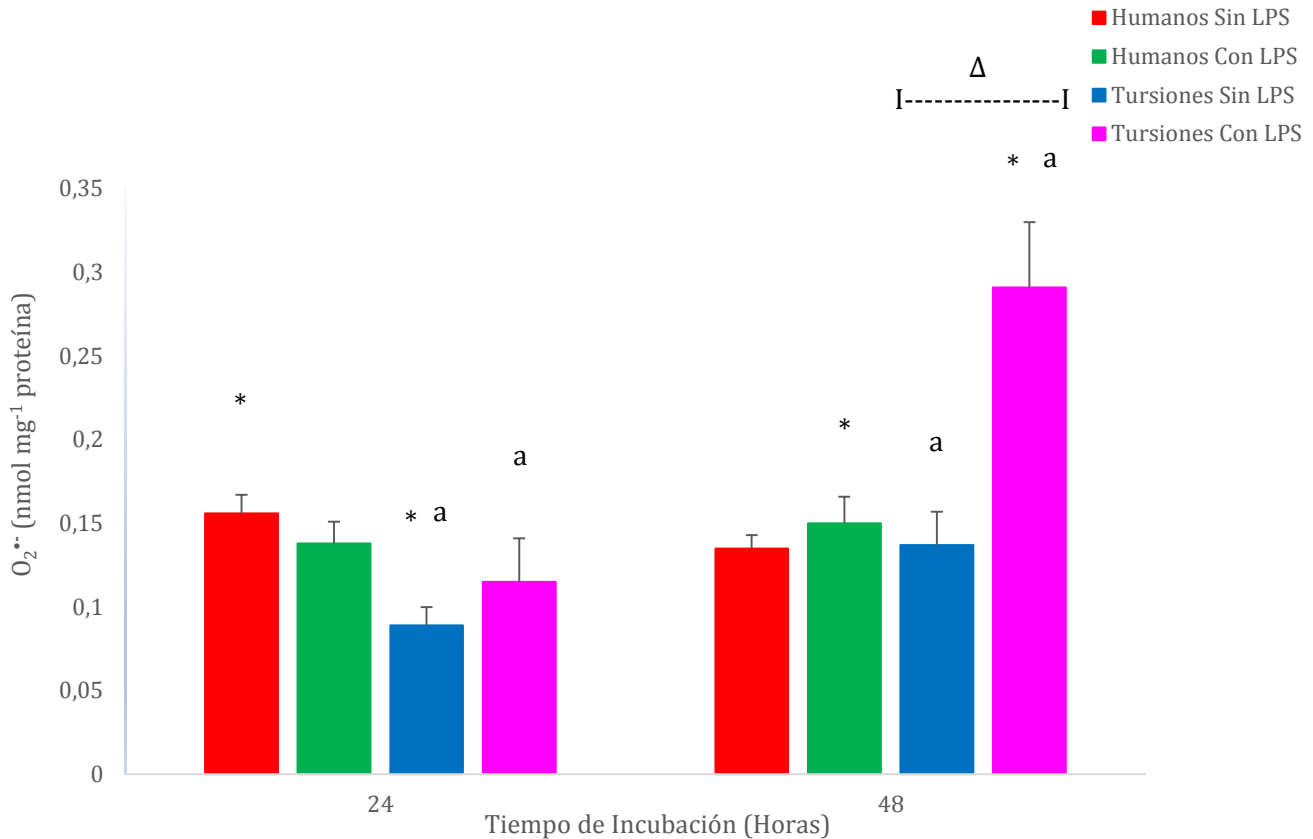
En muestras de *T. truncatus gilli* en ausencia de LPS a las 48 h, se observaron menos neutrófilos y más linfocitos en comparación con las 24 h (1.6 veces,  $p = 0.01$ ; 1.1 veces,  $p = 0.005$ , respectivamente). En muestras de *T. truncatus gilli* en presencia de LPS a las 48 h, se observaron menos neutrófilos y más linfocitos en comparación con las 24 h (1.3 veces,  $p = 0.032$ ; 1.1 veces,  $p = 0.014$ , respectivamente).



**Figura 5.** Conteo promedio de (A) neutrófilos, (B) linfocitos, (C) eosinófilos, (D) monocitos, y (E) basófilos de *Homo sapiens* (n = 10) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre especies,  $\Delta$  dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie con tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> dentro de la misma especie y concentración de LPS con tiempos de incubación diferentes que 24 horas.

### 7.3. Producción de radical superóxido en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos

Los resultados de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en *H. sapiens* (n = 12) y *T. truncatus gilli* (n = 12) en respuesta a la exposición a LPS se muestran en la **Tabla IIA** y la **Fig. 6**. En ausencia de LPS a 24 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  en las muestras de *H. sapiens* en comparación con las de *T. truncatus gilli* (1.7 veces, p = 0.001). En presencia de LPS (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  en las muestras de *T. truncatus gilli* en comparación con las de *H. sapiens* (1.9 veces, p = 0.004). En las muestras de *T. truncatus gilli* en presencia de LPS a 48 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  en comparación con aquellas en ausencia de LPS (2.1 veces, p = 0.005). En ausencia de LPS a 48 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  en las muestras de *T. truncatus gilli* en comparación con las muestras a 24 h (1.5 veces, p = 0.019). En presencia de LPS (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  en las muestras de *T. truncatus gilli* en comparación con la incubación por 24 h (2.5 veces, p = 0.01).



**Figura 6.** Producción de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ , nanomoles miligramo<sup>-1</sup> de proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu g$  LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia ( $10 \mu g$  LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies,  $\Delta$  dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

#### 7.4. Defensas antioxidantes en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos

Los resultados de la actividad enzimática de SOD, CAT, GPx, GR y GST en *H. sapiens* (n = 12) y *T. truncatus gilli* (n = 12) en respuesta a la exposición a LPS se muestran en la **Tabla IIIA** y la **Fig. 7**. En ausencia de LPS a 24 h, en *H. sapiens* se observó mayor actividad de SOD en comparación con *T. truncatus gilli* (2.4 veces, p = 0.002). En presencia de LPS ( $10 \mu g$  LPS mL<sup>-1</sup>) a las 24 h en las muestras de *H. sapiens*, se observó mayor actividad de SOD en comparación con *T. truncatus gilli* (2.3 veces, p = 0.015). A las 24 h en presencia de LPS, las muestras de *T. truncatus gilli* mostraron menor actividad de SOD en comparación con las muestras incubadas en ausencia de LPS (1.8 veces, p = 0.019). En ausencia de LPS a 24 h en los leucocitos de *H. sapiens*, se observó mayor actividad de SOD en

comparación con aquellos incubados en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) (1.9 veces,  $p = 0.008$ ). En ausencia de LPS a 24 h, se observó mayor actividad en las muestras de *H. sapiens* en comparación con 48 h (2.1 veces  $p = 0.004$ ).

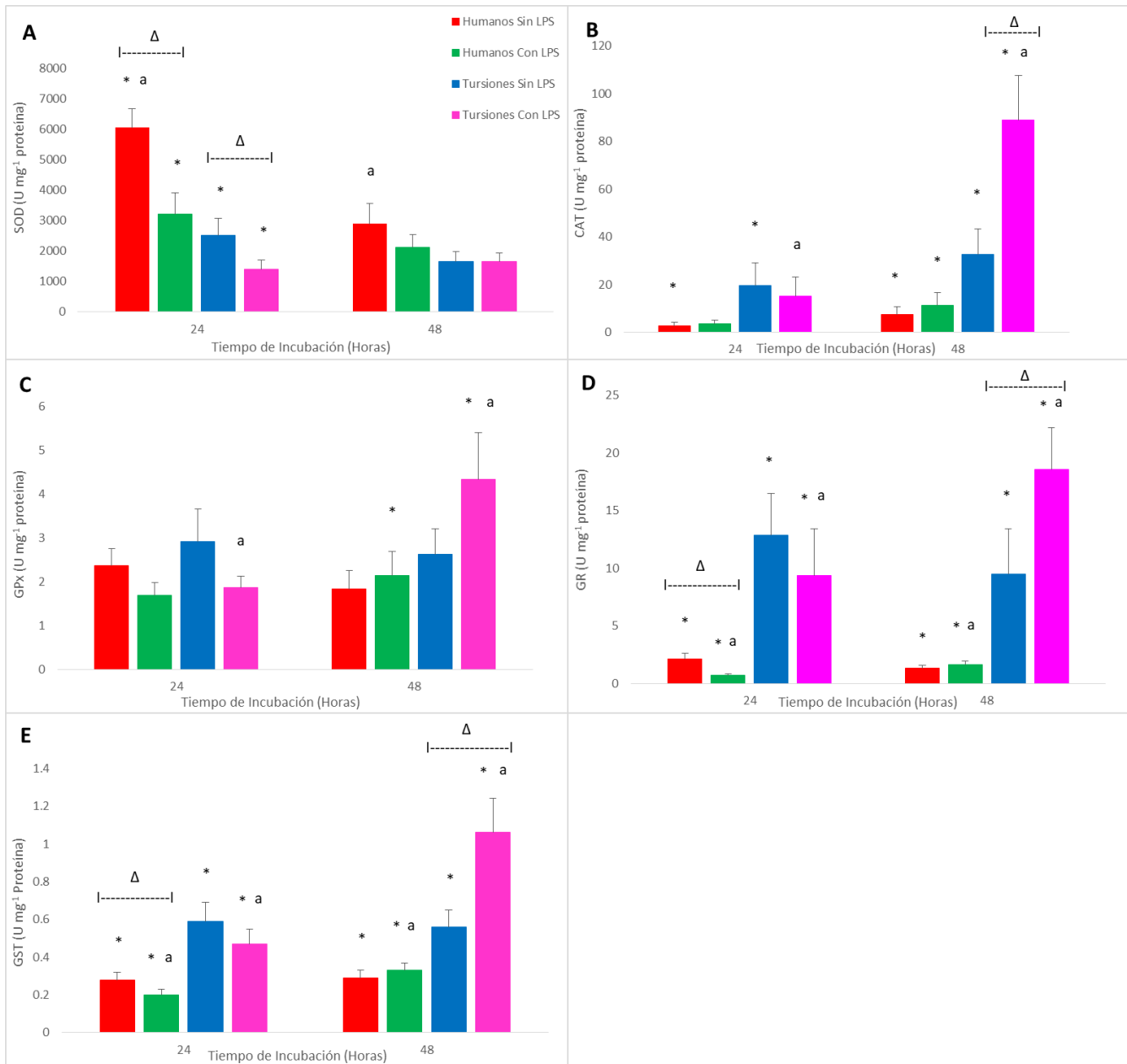
En ausencia de LPS, las muestras de *T. truncatus gilli* mostraron mayor actividad de CAT a 24 y 48 h en comparación con *H. sapiens* (7.6 veces,  $p = 0.038$ ; 4.4 veces,  $p = 0.05$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor actividad de CAT en comparación con *H. sapiens* (7.9 veces,  $p = 0.001$ ). En las muestras de *T. truncatus gilli* en presencia de LPS a 48 h, se observó mayor actividad de CAT en comparación con las muestras en ausencia de LPS y en comparación con la exposición a 24 h (2.7 veces,  $p = 0.015$ ; 5.9 veces,  $p = 0.006$ , respectivamente).

En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a las 48 h, los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron mayor actividad de GPx en comparación con las muestras de *H. sapiens* (2.0 veces,  $p = 0.0038$ ), mientras que los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron mayor actividad a las 48 h en comparación con 24 h (2.3 veces,  $p = 0.05$ ).

En ausencia de LPS, se observó mayor actividad de GR en las muestras de *T. truncatus gilli* a 24 y 48 h en comparación con *H. sapiens* (6.1 veces,  $p = 0.001$ ; 7.2 veces,  $p = 0.00$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) las muestras de *T. truncatus gilli* mostraron mayor actividad de GR a 24 y 48 h en comparación con las muestras de *H. sapiens* (12.9 veces,  $p = 0.00$ ; 11.1 veces,  $p = 0.00$ , respectivamente). En las muestras de *T. truncatus gilli* en presencia de LPS a 48 h, se observó mayor actividad de GR en comparación con las muestras en ausencia de LPS y mayor actividad de GR en comparación con la exposición a 24 h (2.0 veces,  $p = 0.041$ ; 2.0 veces,  $p = 0.034$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 24 h, se observó mayor actividad de GR en las muestras de *H. sapiens* en comparación con aquellas en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) (2.9 veces,  $p = 0.028$ ). En presencia de LPS a 48 h, se observó mayor actividad de GR en las muestras de *H. sapiens* en comparación con aquellas expuestas por 24 h (2.3 veces,  $p = 0.01$ ).

En ausencia de LPS, en leucocitos de *T. truncatus gilli*, se observó mayor actividad de GST a las 24 y 48 h en comparación con *H. sapiens* (2.2 veces,  $p = 0.002$ ; 1.9 veces,  $p = 0.007$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), en leucocitos de *T. truncatus gilli*, se observó mayor actividad de

GST a las 24 y 48 h en comparación con *H. sapiens* (2.4 veces,  $p = 0.005$ ; 3.3 veces,  $p = 0.00$ , respectivamente). A las 48 h de incubación, los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron mayor actividad de GST en presencia de LPS en comparación con ausencia de LPS (1.9 veces,  $p = 0.012$ ). En las muestras de *T. truncatus gilli* en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor actividad de GST en comparación con la exposición por 24 h y en comparación con la exposición en ausencia de LPS (2.3 veces,  $p = 0.004$ ; 1.9 veces,  $p = 0.012$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 24 h, los leucocitos de *H. sapiens* mostraron mayor actividad de GST en comparación con aquellos en presencia de LPS, mientras que los leucocitos incubados durante 48 h en presencia de LPS mostraron mayor actividad en comparación con la exposición a 24 h (1.4 veces,  $p = 0.034$ ; 1.7 veces,  $p = 0.003$ , respectivamente).



**Figura 7.** Actividad de (A) superóxido dismutasa (SOD, unidades miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) catalasa (CAT, unidades miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (C) glutatión peroxidasa (GPx, unidades miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (D) glutatión reductasa (GR, unidades miligramo<sup>-1</sup> de proteína), y (E) glutatión S-transferasa (GST, unidades miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, Δ dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

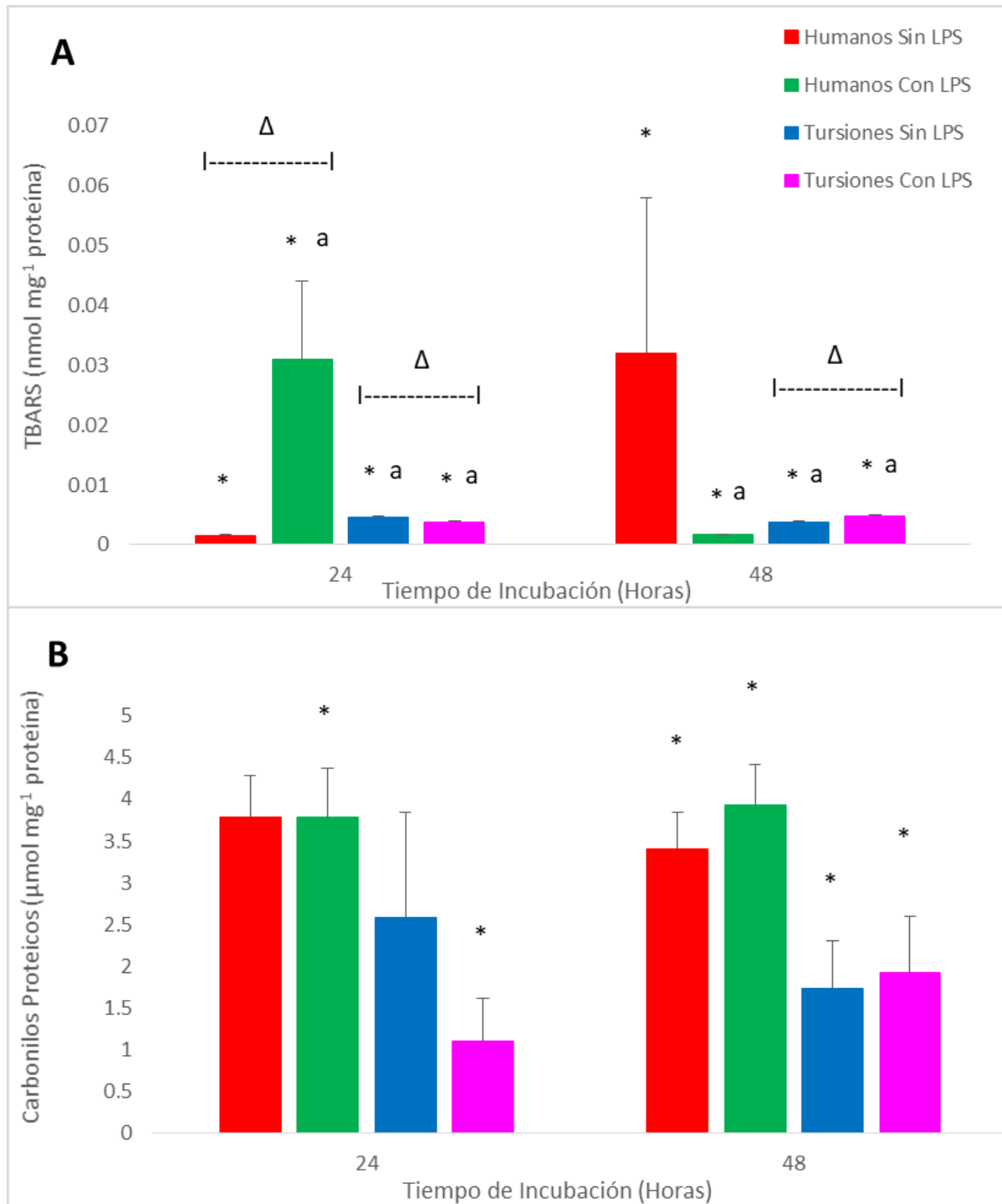


### 7.5. Daño oxidativo en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos

Los resultados de la concentración de TBARS y carbonilos proteicos en *H. sapiens* (n = 12) y *T. truncatus gilli* (n = 12) en respuesta a la exposición a LPS se muestran en la **Tabla IVA** y la **Fig. 8**. En las muestras de *T. truncatus gilli* en ausencia de LPS, se observó una mayor concentración de TBARS a 24 h y una menor concentración de TBARS a 48 h en comparación con las muestras *H. sapiens* (2.8 veces, p = 0.00; 8.5 veces, p = 0.038, respectivamente). En presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>), se observó una menor concentración de TBARS en las muestras de *T. truncatus gilli* a 24 h y una mayor concentración de TBARS a 48 h en comparación con las muestras de *H. sapiens* (8.5 veces, p = 0.00; 2.8 veces, p = 0.00, respectivamente).

En las muestras de *T. truncatus gilli* en ausencia de LPS, se observó mayor concentración de TBARS a 24 h y menor concentración de TBARS a 48 h en comparación con las muestras en presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) (1.2 veces, p = 0.005; 1.3 veces, p = 0.002, respectivamente). En ausencia de LPS a 24 h, se observó una mayor concentración de TBARS en las muestras de *T. truncatus gilli* en comparación con la exposición a 48 h (1.2 veces, p = 0.01). En presencia de LPS a 48 h, las muestras de *T. truncatus gilli* mostraron una mayor concentración de TBARS en comparación con 24 h (1.3 veces, p = 0.001). En presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) a 24 h, las muestras de *H. sapiens* mostraron una mayor concentración de TBARS en comparación a las muestras en ausencia de LPS y una mayor concentración de TBARS en comparación con la exposición a 48 h (19.5 veces, p = 0.049; 18.1 veces, p = 0.05, respectivamente).

En ausencia de LPS a 48 h, se observó una mayor concentración de carbonilos proteicos en las muestras de *H. sapiens* en comparación con las de *T. truncatus gilli* (2.0 veces, p = 0.029). En presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>), se observó una mayor concentración de carbonilos proteicos a 24 y 48 h en comparación con *T. truncatus gilli* (3.4 veces, p = 0.002; 2.0 veces, p = 0.023, respectivamente).



**Figura 8.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), y (B) carbonilos proteicos (μmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, Δ dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

## 7.6. Respuesta de leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez

No se pudo realizar el análisis estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre los estadios de madurez y géneros en *H. sapiens*, ya que estos datos fueron confidenciales. Sin embargo, el análisis estadístico se realizó en *T. truncatus gilli* para determinar si existían diferencias significativas entre los estadios de madurez y sexos. Como la mayoría de los tursiones alojados en Cabo Dolphins nacieron ahí, se conoce la edad de cada individuo. El sexo de cada individuo se determinó después del parto mediante la identificación de la presencia o ausencia de glándulas mamarias ubicadas a ambos lados de la hendidura genital. En *T. truncatus*, las hembras generalmente alcanzan la madurez sexual a los 10 a 12 años, mientras que los machos alcanzan la madurez sexual después de los 12 años (Sergeant, 1973). La madurez de las hembras se determinó a través de exámenes físicos de rutina con ultrasonografía; las hembras fueron consideradas sexualmente maduras pasado el primer período de ovulación. Antes de un evento de reproducción exitoso, la madurez en los machos se estima utilizando la edad, el tamaño de los testículos mediante ultrasonografía, y la longitud total del cuerpo (Sergeant, 1973).

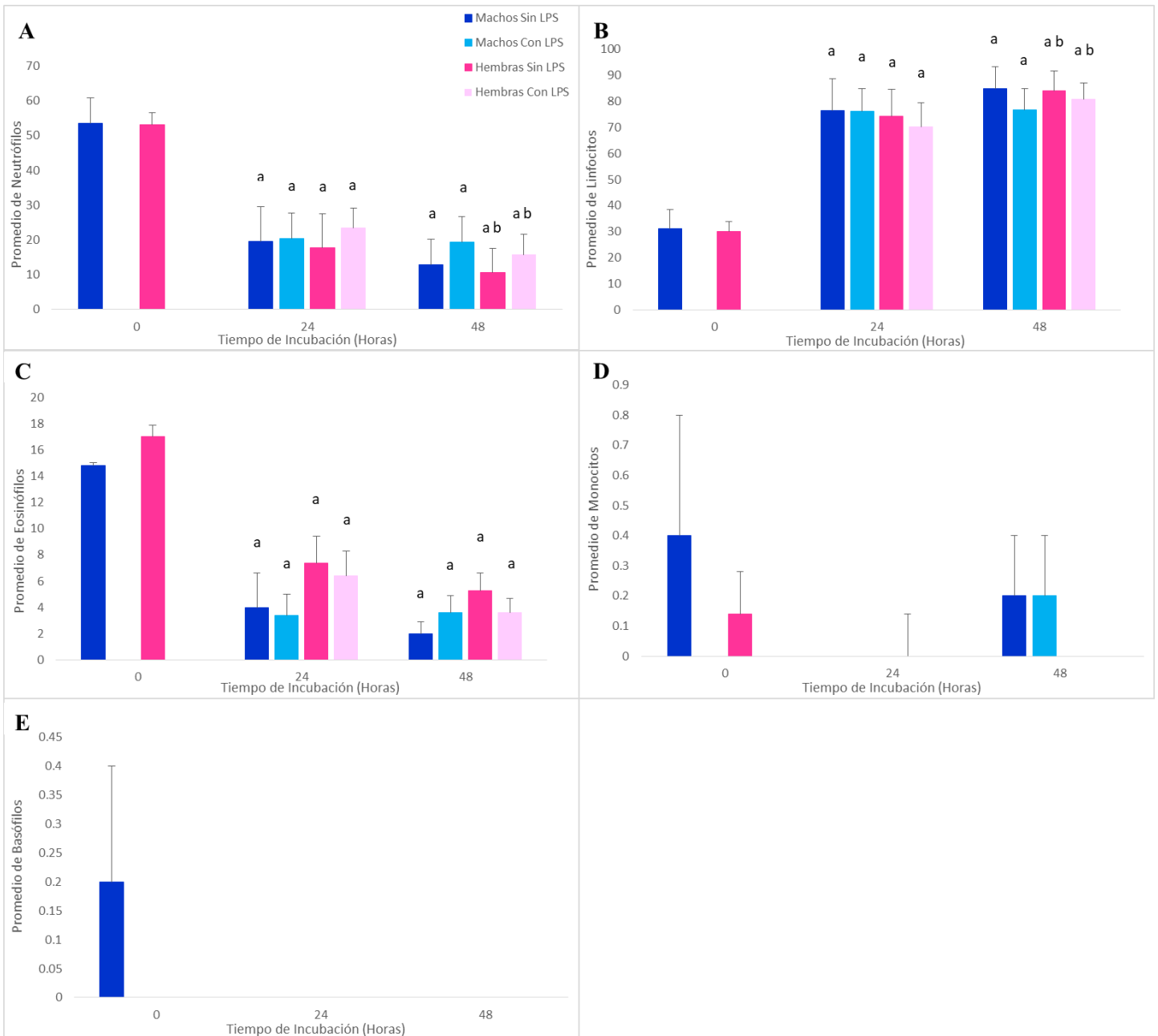
### 7.6.1. Conteo diferencial de leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez

Los resultados de la identificación y conteo de los diferentes tipos de leucocitos en muestras de machos ( $n = 5$ ) y hembras ( $n = 7$ ) de *T. truncatus gilli*, se presentan en la **Tabla VA** y la **Fig. 9**. No se observaron diferencias significativas al comparar los conteos diferenciales de leucocitos entre machos y hembras.

Los resultados de la identificación y conteo de los diferentes tipos de leucocitos en muestras de machos y hembras de *T. truncatus gilli*, por tiempo de incubación, se presentan en la **Tabla VA** y la **Fig. 9**. En muestras de hembras en ausencia de LPS a 0 h, se observaron más neutrófilos, menos linfocitos y más eosinófilos en comparación con la incubación por 24 h (3.0 veces,  $p = 0.018$ ; 2.5 veces,  $p = 0.018$ ; 2.3 veces,  $p = 0.018$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 24 h, en las muestras de las hembras se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con las muestras en condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (2.3 veces,  $p = 0.018$ ; 2.3 veces,  $p = 0.018$ ; 2.7 veces,  $p = 0.016$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 48 h, las muestras de hembras mostraron

menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con las muestras en condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (5.0 veces,  $p = 0.018$ ; 2.8 veces,  $p = 0.018$ ; 3.2 veces,  $p = 0.018$ , respectivamente). En muestras de hembras en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con las muestras en condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (3.4 veces,  $p = 0.018$ ; 2.7 veces,  $p = 0.018$ ; 4.7 veces,  $p = 0.018$ , respectivamente). En muestras de hembras en ausencia de LPS a 24 h, se observaron más neutrófilos y menos linfocitos en comparación con la exposición a 48 h (1.7 veces,  $p = 0.028$ ; 1.1 veces,  $p = 0.018$ , respectivamente). En muestras de hembras en presencia de LPS a 24 h, se observaron más neutrófilos y menos linfocitos en comparación con la exposición a 48 h (1.5 veces,  $p = 0.027$ ; 1.2 veces,  $p = 0.028$ , respectivamente).

En muestras de machos en ausencia de LPS a 0 h, se observaron más neutrófilos, menos linfocitos y más eosinófilos en comparación con el cultivo a 24 h (2.7 veces,  $p = 0.043$ ; 2.5 veces,  $p = 0.043$ ; 3.7 veces,  $p = 0.042$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 24 h, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en las muestras de los machos en comparación con las muestras en condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (2.6 veces,  $p = 0.043$ ; 2.5 veces,  $p = 0.043$ ; 4.4 veces,  $p = 0.042$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 48 h, las muestras de los machos mostraron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con las condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (4.2 veces,  $p = 0.043$ ; 2.7 veces,  $p = 0.043$ ; 7.4 veces,  $p = 0.042$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, los machos mostraron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con las condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (2.8 veces,  $p = 0.043$ ; 2.5 veces,  $p = 0.043$ ; 4.1 veces,  $p = 0.042$ , respectivamente).



**Figura 9.** Conteo promedio de (A) neutrófilos, (B) linfocitos, (C) eosinófilos, (D) monocitos, y (E) basófilos de *Tursiops truncatus gilli* machos ( $n=5$ ) y hembras ( $n=7$ ) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos,  $\Delta$  dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo con tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de LPS con tiempos de incubación diferentes que 24 horas.

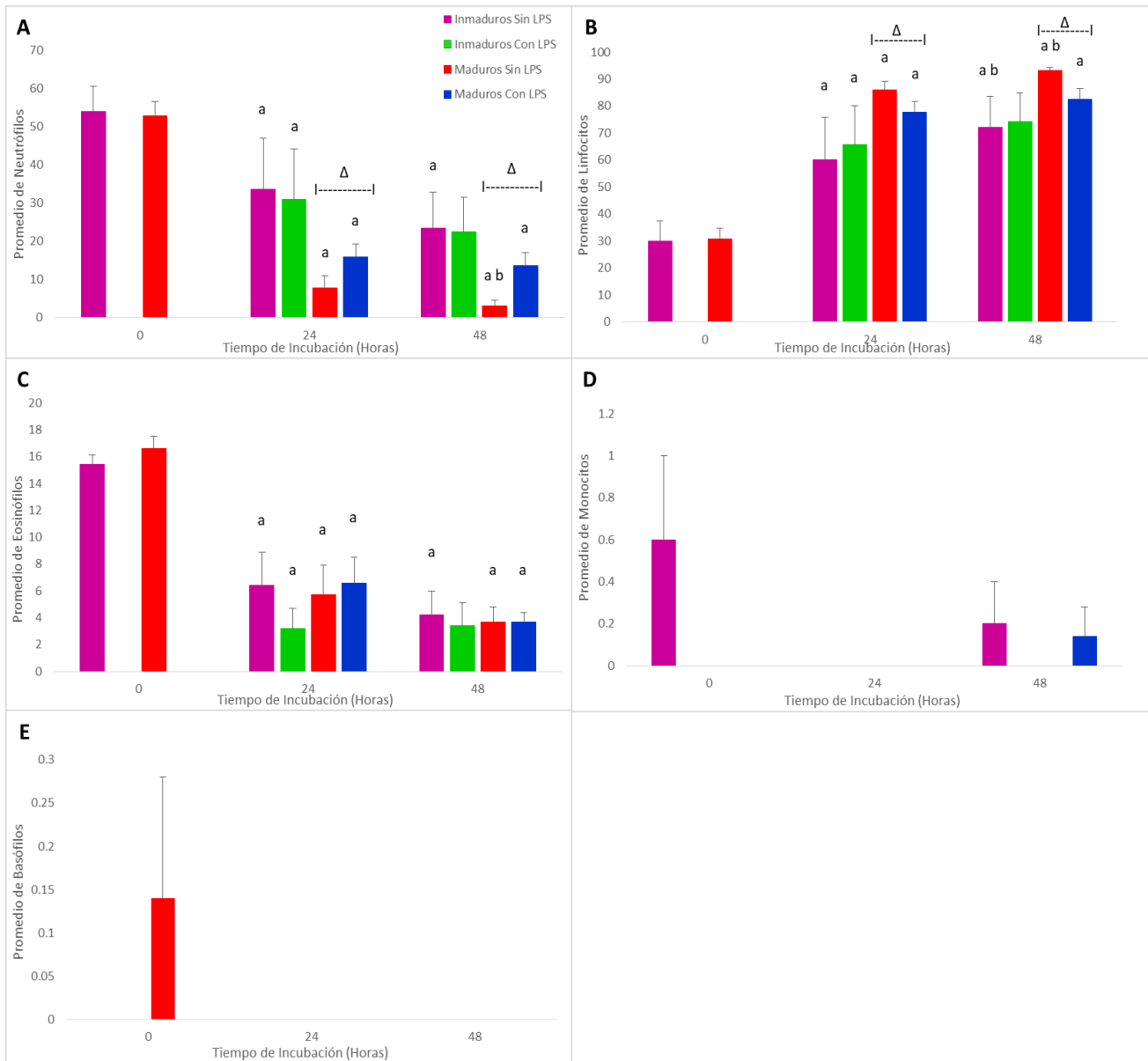
Los resultados de la identificación y conteo de los diferentes tipos de leucocitos en muestras de *T. truncatus gilli* inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7), se presentan en la **Tabla VIA** y la **Fig. 10**. No se observaron diferencias significativas en los conteos diferenciales entre los estadios de madurez en los leucocitos de *T. truncatus gilli*.

Los resultados de la identificación y conteo de los diferentes tipos de leucocitos en cada estadio de madurez en muestras de *T. truncatus gilli*, por concentración de LPS, se presentan en la **Tabla VIA** y la **Fig. 10**. En las muestras de animales maduros en ausencia de LPS a 24 h, se observaron menos neutrófilos y más linfocitos en comparación con la presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) (2.1 veces,  $p = 0.018$ ; 1.1 veces,  $p = 0.027$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 48 h, en animales maduros se observaron menos neutrófilos y más linfocitos en comparación con presencia de LPS (4.4 veces,  $p = 0.028$ ; 1.1 veces,  $p = 0.027$ , respectivamente).

Los resultados de la identificación y conteo de los diferentes tipos de leucocitos en cada estadio de madurez en muestras de *T. truncatus gilli*, por tiempo de incubación, se presentan en la **Tabla VIA** y la **Fig. 10**. En las muestras de animales inmaduros en ausencia de LPS a 0 h, se observaron más neutrófilos y menos linfocitos y más eosinófilos en comparación con el cultivo por 24 h (1.6 veces,  $p = 0.043$ ; 2.0 veces,  $p = 0.043$ ; 2.4 veces,  $p = 0.043$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 24 h, los animales inmaduros mostraron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos (1.7 veces,  $p = 0.043$ ; 2.2 veces,  $p = 0.043$ ; 4.8 veces,  $p = 0.042$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 48 h, en animales inmaduros se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con las condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (2.3 veces,  $p = 0.043$ ; 2.4 veces,  $p = 0.043$ ; 3.7 veces,  $p = 0.043$ , respectivamente). En muestras de tursiones inmaduros en ausencia de LPS a 24 h, se observaron menos linfocitos en comparación con el cultivo por 48 h (1.2 veces,  $p = 0.042$ ).

En muestras de animales maduros en ausencia de LPS a 0 h, se observaron más neutrófilos, menos linfocitos y más eosinófilos en comparación con el cultivo a 24 h (6.9 veces,  $p = 0.018$ ; 2.8 veces,  $p = 0.018$ , 2.9 veces,  $p = 0.018$ , respectivamente). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 24 h, las muestras de los tursiones maduros mostraron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con aquellas en condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (1.7 veces,  $p = 0.018$ ; 2.1 veces,  $p = 0.018$ ; 5.2 veces,  $p = 0.017$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 0 h, en tursiones

maduros se observaron más neutrófilos, menos linfocitos y más eosinófilos en comparación con el cultivo a 48 h (17.1 veces,  $p = 0.018$ ; 3.0 veces,  $p = 0.018$ ; 4.5 veces,  $p = 0.017$ , respectivamente). En tursiones maduros en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observaron menos neutrófilos, más linfocitos y menos eosinófilos en comparación con las condiciones basales (0 h ausencia de LPS) (2.4 veces,  $p = 0.018$ ; 2.4 veces,  $p = 0.018$ ; 4.9 veces,  $p = 0.017$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 24 h, las muestras de tursiones maduros mostraron más neutrófilos y menos linfocitos en comparación con el cultivo a 48 h (2.5 veces,  $p = 0.046$ ; 1.1 veces,  $p = 0.034$ , respectivamente).



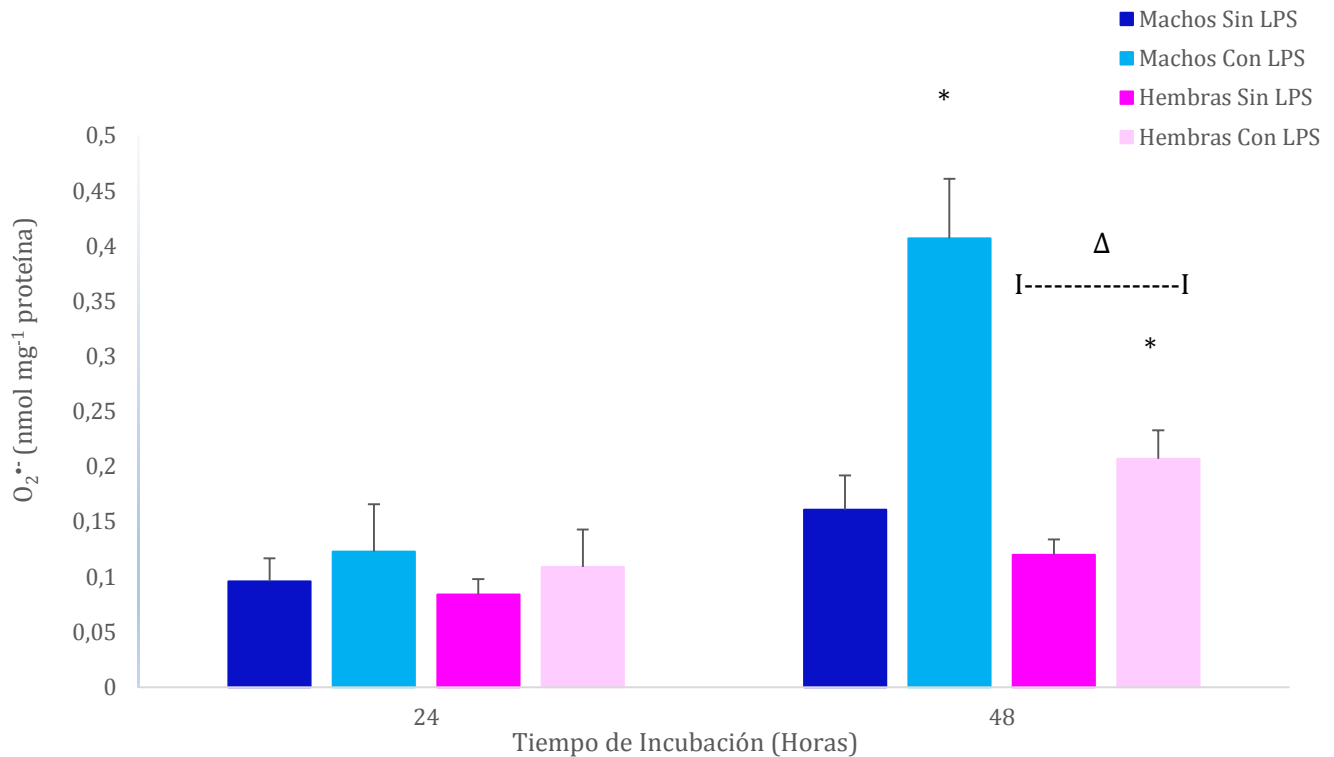
**Figura 10.** Conteo promedio de (A) neutrófilos, (B) linfocitos, (C) eosinófilos, (D) monocitos, (E) basófilos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros ( $n = 5$ ) y maduros ( $n = 7$ ) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez con tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> dentro del mismo estadio de madurez y concentración de LPS con tiempos de incubación diferentes que 24 horas.



### 7.6.2. Producción de radical superóxido en leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez

Los resultados de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en *T. truncatus gilli*, machos (n = 5) y hembras (n = 7), en respuesta a la exposición a LPS se muestran en la **Tabla VIIA** y la **Fig. 11**. En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\cdot-}$  en machos en comparación con hembras (2.0 veces,  $p = 0.012$ ).

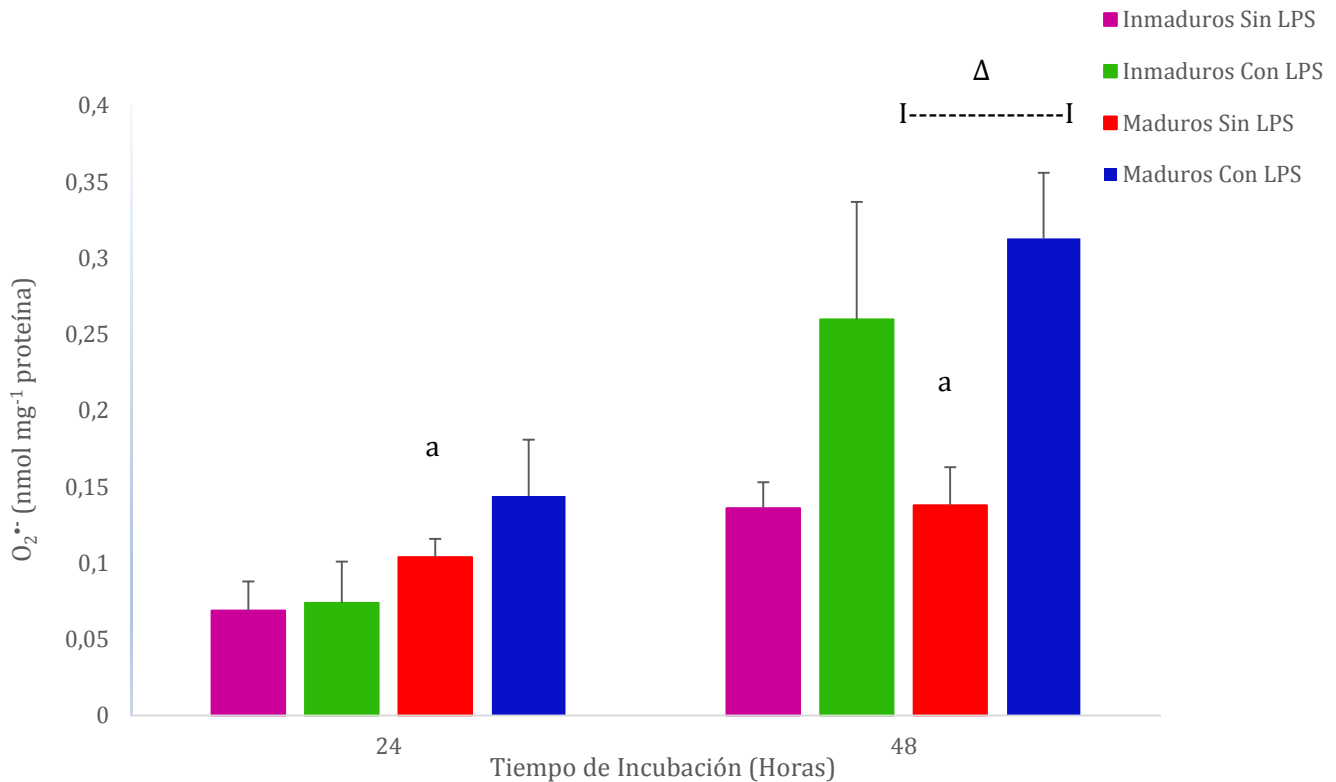
Los resultados de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en *T. truncatus gilli* machos y hembras, por concentración de LPS se muestran en la **Tabla VIIA** y la **Fig. 11**. En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, las muestras de las hembras mostraron mayor producción de  $O_2^{\cdot-}$  en comparación con ausencia de LPS (1.7 veces,  $p = 0.028$ ).



**Figura 11.** Producción de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ , nanomoles miligramo<sup>-1</sup> de proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n= 5) y hembras (n = 7) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedios  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos,  $\Delta$  dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos,  $^a$  dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

Los resultados de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en *T. truncatus gilli* inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7) en respuesta a la exposición a LPS se muestran en la **Tabla VIIA** y la **Fig. 12**. No se observaron diferencias significativas entre estadios de madurez.

Los resultados de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en *T. truncatus gilli* inmaduros y maduros en respuesta a diferentes concentraciones de LPS y tiempos de incubación se muestran en la **Tabla VIIA** y la **Fig. 12**. En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  en animales maduros en comparación con la ausencia de LPS (2.3 veces,  $p = 0.028$ ). En ausencia de LPS a 48 h, se observó mayor producción de  $O_2^{\bullet-}$  en animales maduros en comparación con 24 h (1.3 veces,  $p = 0.043$ ).



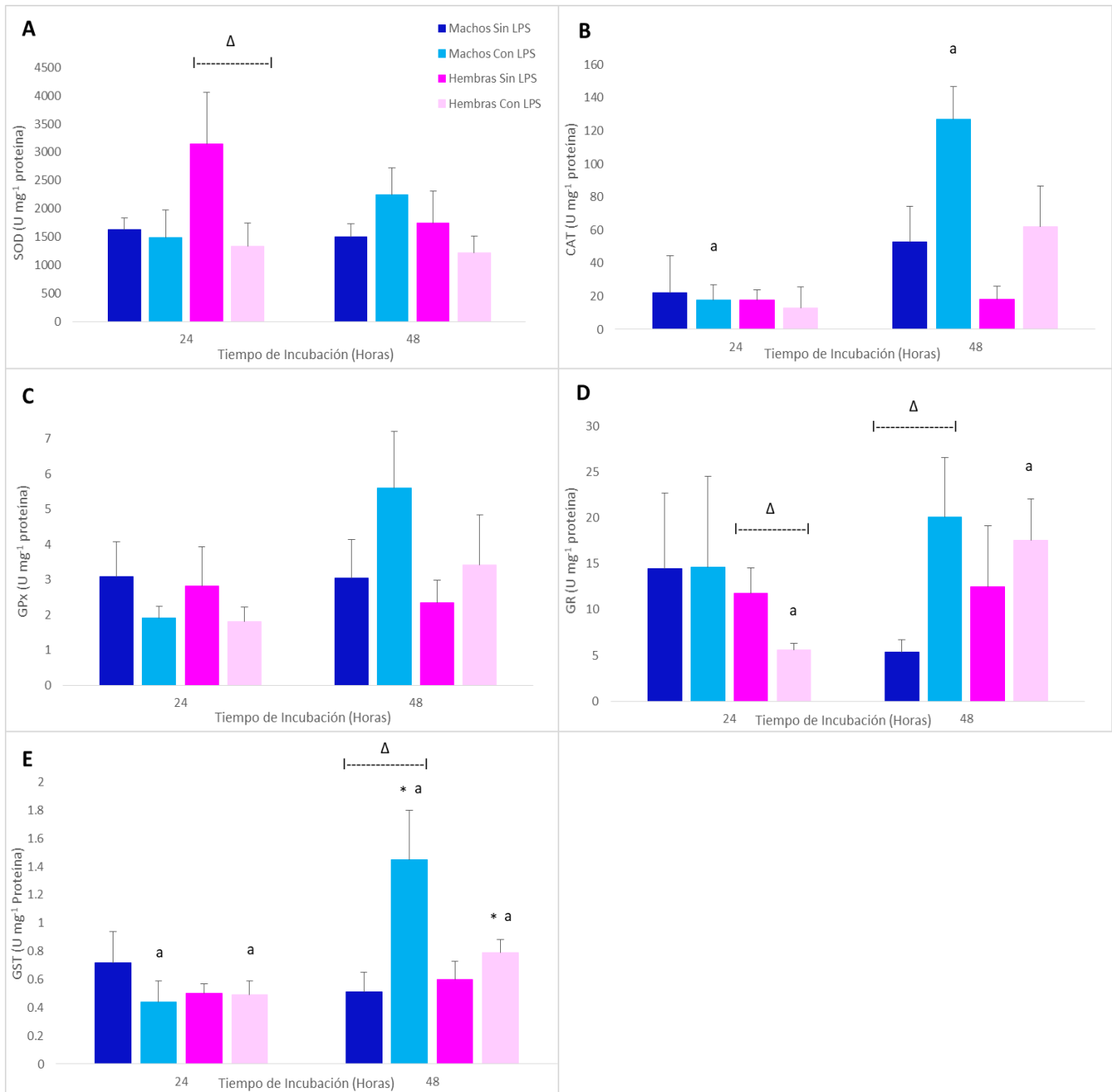
**Figura 12.** Producción de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ , nanomoles miligramo<sup>-1</sup> proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n= 5) y maduros (n = 7) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

### 7.6.3. Actividad enzimática en leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez

Los resultados de las actividades de SOD, CAT, GPx, GR y GST en machos (n = 5) y hembras (n = 7) de *T. truncatus gilli* se muestran en la **Tabla VIII A** y la **Fig. 13**. No se observaron diferencias significativas en la actividad de SOD entre machos y hembras. Sin embargo, a las 24 h en ausencia de LPS, las hembras mostraron mayor actividad de SOD en comparación con en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) (2.4 veces,  $p = 0.018$ ). No se observaron diferencias significativas en la actividad de CAT entre sexos. En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor actividad de CAT en machos en comparación con 24 h (7.2 veces,  $p = 0.043$ ). No se observaron diferencias significativas en la actividad de GPx entre sexos.

No se observaron diferencias significativas en la actividad de GR entre sexos. Sin embargo, en ausencia de LPS a 24 h, se observó mayor actividad de GR en hembras en comparación con la presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) (2.1 veces,  $p = 0.043$ ). En presencia de LPS a 48 h, se observó mayor actividad de GR en hembras en comparación con 24 h (3.1 veces,  $p = 0.028$ ). En las muestras de los machos en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor actividad de GR en comparación con la ausencia de LPS (3.8 veces,  $p = 0.043$ ).

A las 48 h de incubación en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), en las muestras de los machos se observó mayor actividad de GST en comparación con hembras (1.8 veces,  $p = 0.028$ ). En presencia de LPS a 48 h, las muestras de las hembras mostraron mayor actividad de GST en comparación con 24 h (1.6 veces,  $p = 0.043$ ). En presencia de LPS a 48 h, los machos mostraron mayor actividad de GST en comparación con 24 h y mayor actividad en comparación con la ausencia de LPS (3.3 veces,  $p = 0.043$ ; 2.9 veces,  $p = 0.043$ , respectivamente).

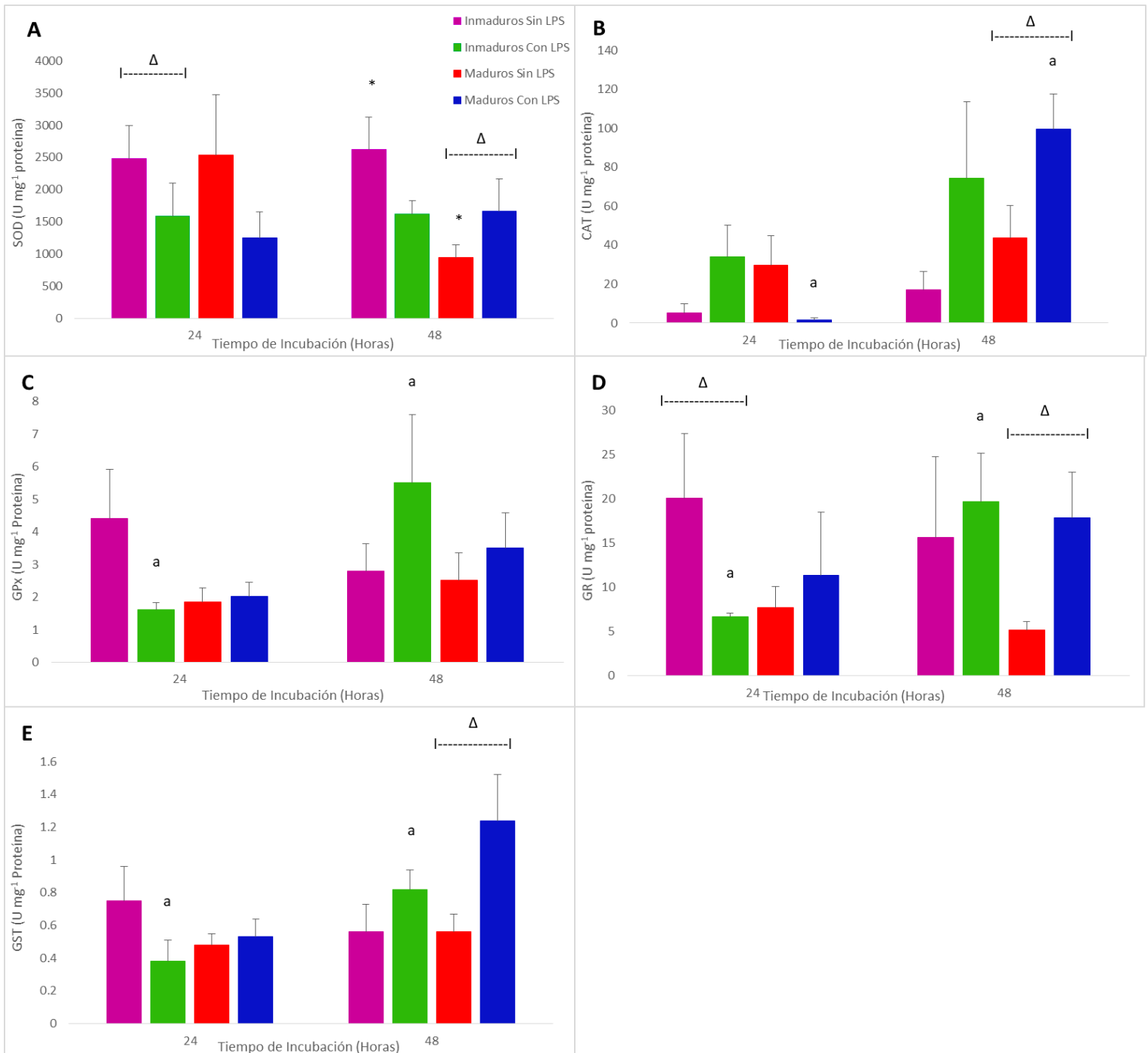


**Figura 13.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n = 5) y hembras (n = 7) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedios ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre sexos, Δ dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

Los resultados de las actividades de SOD, CAT, GPx, GR y GST en tursiones inmaduros ( $n = 5$ ) y maduros ( $n = 7$ ) se muestran en la **Tabla IXA** y la **Fig. 14**. En ausencia de LPS a las 48 h, en los tursiones inmaduros la actividad de SOD fue mayor en comparación con los animales maduros (2.8 veces,  $p = 0.028$ ). A las 24 h en ausencia de LPS, en las muestras de tursiones inmaduros se observó mayor actividad de SOD en comparación con muestras expuestas a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) (1.6 veces,  $p = 0.043$ ). A las 48 h en presencia de LPS, se observó mayor actividad de SOD en tursiones maduros en comparación con ausencia de LPS (1.8 veces,  $p = 0.043$ ).

No se observaron diferencias significativas en la actividad de CAT entre estadios de madurez. Sin embargo, en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48h, se observó mayor actividad de CAT en comparación a 24 h y más actividad de CAT en comparación con la ausencia de LPS (64.3 veces,  $p = 0.018$ ; 2.3 veces,  $p = 0.028$ , respectivamente). No se observaron diferencias significativas en la actividad de GPx entre estadios de madurez. Sin embargo, en presencia de LPS a 48 h, los animales inmaduros mostraron mayor actividad de GPx en comparación con 24 h (3.4 veces,  $p = 0.043$ ).

No se observaron diferencias significativas en la actividad de GR entre estadios de madurez. En las muestras de tursiones inmaduros en presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 24 h, se observó menor actividad de GR en comparación a 48 h y en comparación con la ausencia de LPS (3.0 veces,  $p = 0.043$ ; 3.0 veces,  $p = 0.043$ , respectivamente). En presencia de LPS a 48 h, se observó mayor actividad de GR en las muestras de tursiones maduros en comparación con la ausencia de LPS (3.5 veces,  $p = 0.028$ ). No se identificaron diferencias significativas en la actividad de GST entre estadios de madurez. En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, se observó mayor actividad de GST en los animales inmaduros en comparación con 24 h (2.2 veces,  $p = 0.043$ ). En las muestras de tursiones maduros en presencia de LPS a 48 h, se observó mayor actividad de GST en comparación con ausencia de LPS (2.2 veces,  $p = 0.028$ ).



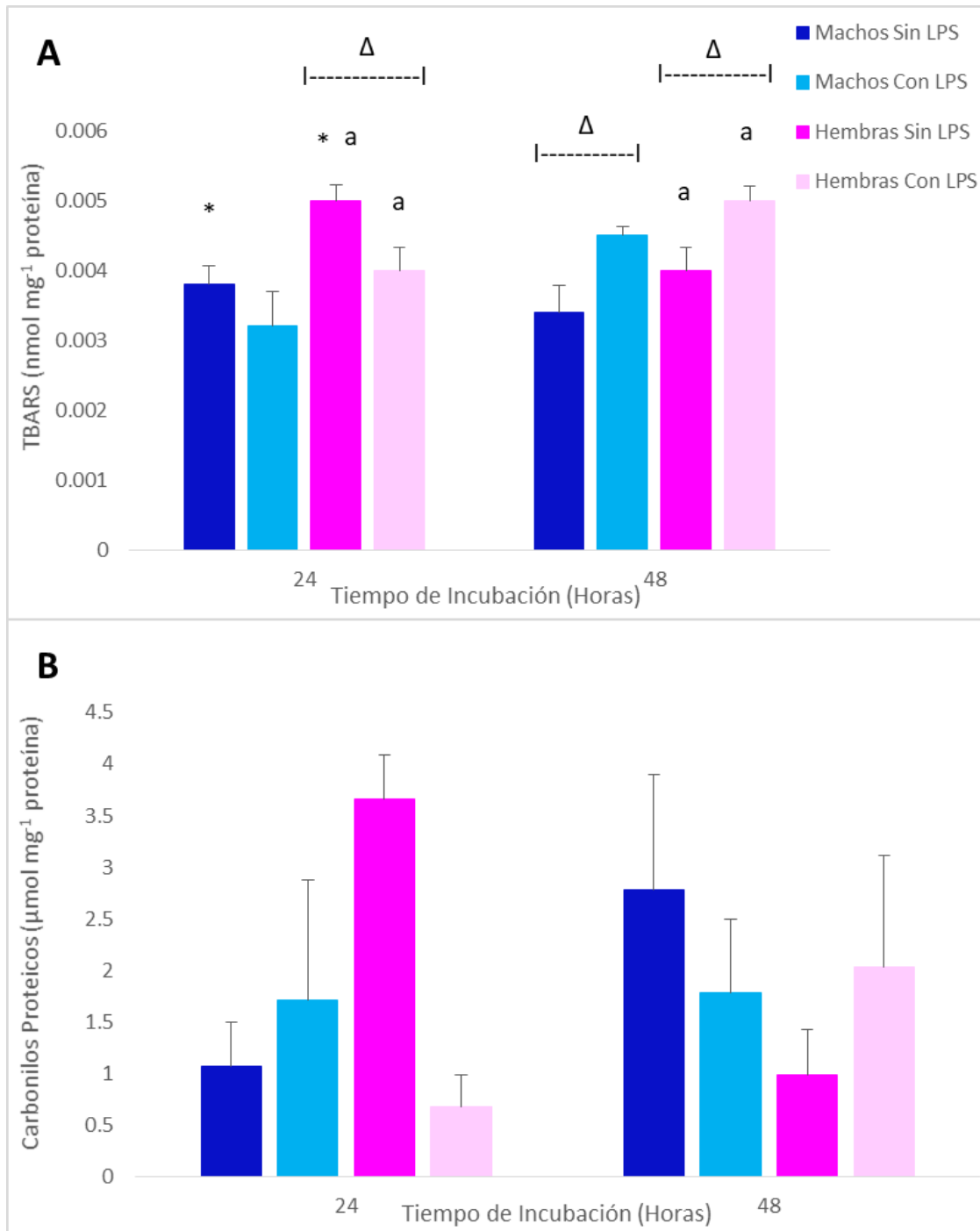
**Figura 14.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n= 5) y maduros (n = 7) en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

#### **7.6.4. Daño oxidativo en leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez**

Los resultados de la concentración de TBARS y carbonilos proteicos en *T. truncatus gilli* machos (n = 5) y hembras (n = 7) en respuesta a la exposición a LPS se muestran en la **Tabla XA** y la **Fig. 15**. En ausencia de LPS a 24 h, los leucocitos de las hembras tuvieron mayores niveles de TBARS en comparación con los de los machos (1.3 veces,  $p = 0.008$ ). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 24 h, se observó menor concentración de TBARS en las muestras de hembras en comparación con aquellas en ausencia de LPS (1.2 veces,  $p = 0.021$ ). En presencia de LPS a 48 h, se observó mayor concentración de TBARS en las muestras de hembras en comparación con aquellas en ausencia de LPS (1.3 veces,  $p = 0.037$ , respectivamente). En ausencia de LPS a 48 h, los leucocitos de las hembras mostraron mayores niveles de TBARS en comparación con los cultivados por 24 h (1.0 veces,  $p = 0.037$ ). En presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a 48 h, las muestras de las hembras mostraron mayor concentración de TBARS en comparación con aquellas expuestas a 24 h (1.3 veces,  $p = 0.018$ ). En presencia de LPS a 48 h, los leucocitos de los machos mostraron mayor concentración de TBARS en comparación con aquellos en ausencia de LPS (1.3 veces,  $p = 0.033$ ).

No se identificaron diferencias significativas en la concentración de carbonilos proteicos entre sexos en *T. truncatus gilli*.

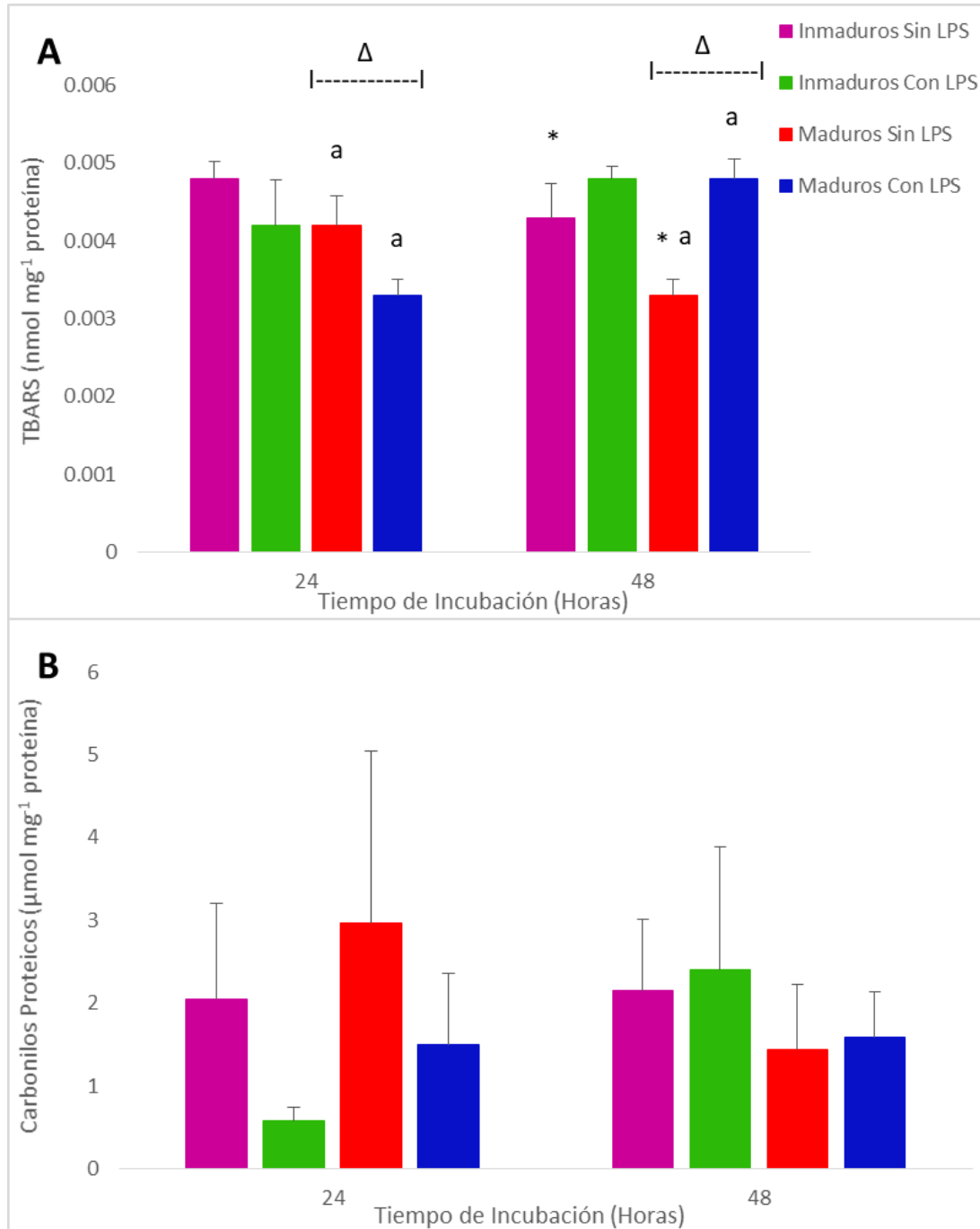




**Figura 15.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) carbonilos proteicos (μmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n = 5) y hembras (n = 7) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre sexos, Δ dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

Los resultados de la concentración de TBARS y carbonilos proteicos en *T. truncatus gilli* inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7) en respuesta a la exposición a LPS se muestran en la **Tabla XIA** y la **Fig. 16**. En ausencia de LPS a 48 h, las muestras de los tursiones inmaduros mostraron mayor concentración de TBARS en comparación con animales maduros (1.3 veces, p = 0.048). En presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>), los leucocitos de tursiones maduros mostraron menores niveles de TBARS a 24 h en comparación con aquellos en ausencia de LPS y mayor concentración de TBARS a 48 h en comparación con aquellos en ausencia de LPS (1.3 veces, p = 0.009; 1.4 veces, p = 0.003, respectivamente). En ausencia de LPS a 24 h, se observó mayor concentración de TBARS en las muestras de tursiones maduros en comparación con aquellas cultivadas a 48 h (1.3 veces, p = 0.038). En presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) a 48 h, los leucocitos de los tursiones maduros mostraron mayores niveles de TBARS en comparación con la exposición a 24 h (1.4 veces, p = 0.00).

No se identificaron diferencias significativas en la concentración de carbonilos proteicos entre estadios de madurez en *T. truncatus gilli*.



**Figura 16.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS,  $\text{nmol miligramo}^{-1}$  de proteína), (B) carbonilos proteicos ( $\mu\text{mol miligramo}^{-1}$  de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros ( $n = 5$ ) y maduros ( $n = 7$ ) en cultivo primario en ausencia ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez,  $\Delta$  dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Viabilidad celular y concentración letal en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos

Con base en las discrepancias en los valores estimados de  $LC_{50}$  en *H. sapiens* y la incapacidad para estimar el  $LC_{50}$  en *T. truncatus gilli*, se calculó el  $LC_{25}$  para ambas especies utilizando el análisis probit de Finney (1952). El análisis probit se utiliza en toxicología para relacionar la dosificación de una toxina con la mortalidad de una población de estudio (Finney y Stevens, 1948); por lo tanto, este modelo se ajusta al propósito del presente estudio. Se calculó la  $LC_{25}$  de LPS en  $6.968 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  para leucocitos de *H. sapiens* y  $14.114 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  para leucocitos de *T. truncatus gilli* a 48 horas. Se ha reportado mayor sensibilidad en *H. sapiens* a los efectos de LPS, tal que los humanos requieren una dosis de LPS menor para exhibir efectos fisiológicos en comparación con roedores, incluyendo conejos (Wolff, 1973). Ello es consistente con los resultados obtenidos en este estudio.

Los gráficos de mortalidad (**Fig. 4**) mostraron una disminución en la viabilidad de los leucocitos a las 48 horas en comparación con las 24 horas en *T. truncatus gilli*. Este resultado es similar a lo reportado por Lee *et al.* (1993), quienes no reportaron diferencias significativas en la muerte celular *in vitro* antes de 24 horas de exposición a  $1 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ . La viabilidad celular de los leucocitos de *H. sapiens* y *T. truncatus gilli* puede variar entre individuos y con la composición celular de cada muestra y de cada alícuota. Las diferencias de longevidad para cada tipo de leucocito pueden repercutir en la mortalidad leucocitaria observada para cada individuo y alícuota. Por ejemplo, los granulocitos tienen un tiempo de vida media de pocas horas a días, el tiempo de vida media más corto entre los tipos de leucocitos, mientras que los agranulocitos tienen un tiempo de vida media de meses a años (Chmielewski *et al.*, 2016).

### 8.2. Conteo diferencial de leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos

Las bacterias son invasores secundarios comunes de las heridas, superficiales o mayores, y han sido implicadas en la aparición de septicemia y la muerte en *H. sapiens* (Cherifi *et al.*, 1990; Carrillo-Casas *et al.*, 2013). Además de *H. sapiens*, se han aislado bacterias, como *E. coli*, a partir de cultivos obtenidos de heridas resultantes de abrasiones superficiales, heridas por enmalle, mordidas de animales, disparos y golpes de barcos en mamíferos marinos rescatados que pueden desencadenar

septicemia y muerte (Buck *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1998; Lockwood *et al.*, 2006; van Elk *et al.*, 2007; Schaefer *et al.*, 2011). Estudios básicos de inmunotoxicidad *in vivo* se han realizado previamente en voluntarios humanos; sin embargo, en mamíferos marinos, hay poca información disponible debido, principalmente, a restricciones legales y éticas (Levin *et al.*, 2007).

La capacidad de los mamíferos marinos para hacer frente a retos inflamatorios desencadenados por infecciones bacterianas es, en gran medida, desconocida. Los cetáceos y los mamíferos terrestres parecen tener componentes del sistema inmune homólogos (Ruiz *et al.*, 2009). En *T. truncatus* (en libertad y bajo cuidado humano) se han reportado leucogramas diferenciales similares a los de mamíferos terrestres, incluido *H. sapiens* (Williams III *et al.*, 1991; Nouri-Shirazi *et al.*, 2017). Sin embargo, pueden existir algunas diferencias en la función inmune que permiten un aumento aparente de la inmunidad en los mamíferos marinos. Por ejemplo, en los cetáceos se observan con frecuencia heridas graves que serían fatales para el *H. sapiens* como resultado de una lesión interna o pérdida de sangre. En un estudio realizado por Corkeron *et al.* (1987), se observaron en el 36.6% de los *T. truncatus* del ecotipo costero mordidas de tiburones de hasta 45 cm de longitud y 12 cm de profundidad. En 2001, Heithaus reportó que el 74.2% de los juveniles y adultos del ecotipo costero de *T. aduncus*, así como el 40% de sus crías, presentaron evidencia de mordidas de tiburones, mientras que el 42.1% de estos animales mostraron evidencia de mordidas múltiples. En la costa de Northumberland, Inglaterra, un área constantemente expuesta a aguas residuales crudas que contienen alto contenido de enterobacterias como *E. coli*, un individuo de *T. truncatus* maduro con una enfermedad crónica de la piel resultó gravemente herido por una hélice de barco y, aunque las heridas resultantes desarrollaron abscesos infecciosos, el tursión se recuperó después de 2-3 meses sin presentar reinfección (Bloom y Jager, 1994). Con base en estos casos, estudios comparativos de inmunotoxicidad *in vitro* presentan una oportunidad única para revelar variaciones específicas de la especie en respuesta a patógenos.

Sin LPS a 0 h, en las muestras de *T. truncatus gilli* se observaron casi dos veces más eosinófilos en comparación con las muestras de *H. sapiens*. En general, *H. sapiens* tienen un rango de eosinófilos de 1 a 4%, mientras que en *T. truncatus*, el rango puede variar de 11.5 a 40%, dependiendo de las condiciones ambientales (Medway y Geraci, 1964; Shirai y Sakai, 1997; Nouri-Shirazi *et al.*, 2017).

Las diferencias en el conteo de eosinófilos pueden estar relacionadas con adaptaciones fisiológicas al medio marino, diferencias en la dieta, o cargas de parásitos, y esto puede proporcionar a los mamíferos marinos una mayor protección contra bacterias y parásitos en comparación con mamíferos terrestres (Ridgway *et al.*, 1970; Dierauf y Gulland, 2001). Los mamíferos marinos bajo cuidado humano en recintos cerrados y de calidad controlada son alimentados con peces congelados que tienen una menor probabilidad de infección parasitaria, mientras que aquellos con acceso a peces vivos pueden llevar una alta carga de parásitos (Williams III *et al.*, 1991; Dierauf y Gulland, 2001). Nouri-Shirazi *et al.* (2017) observaron que *T. truncatus* mantenidos bajo cuidado humano, tuvieron un conteo relativo de eosinófilos de 12.1%, mientras que, en sus contrapartes silvestres, tuvieron un conteo relativo de 39.6% debido a diferencias en el contenido de parásitos. Del mismo modo, Ruiz *et al.* (2009) observaron que *T. truncatus* silvestres, tuvieron un conteo relativo de eosinófilos del 29%, mientras que animales mantenidos bajo cuidado humano mostraron conteos relativos de eosinófilos del 10% cuando se alojaban en condiciones cerradas y de calidad controlada; y de 14% en bahías mantenidas por humanos.

Shirai y Sakai (1997) observaron diferencias en el conteo relativo de eosinófilos entre las especies de cetáceos mantenidos bajo cuidado humano; encontraron conteos relativos de eosinófilos de 11.5%, 10.3%, y 10.6% en *T. truncatus*, delfines de costados blancos del Pacífico (*Lagenorhynchus obliquidens*), y falsas orcas (*Pseudorca crassidens*), respectivamente.

En todos los tratamientos analizados en el presente estudio, se observaron numerosos basófilos en las muestras de leucocitos de *H. sapiens*, mientras que sólo en un individuo de *T. truncatus gilli* se observó un basófilo (bajo condiciones control; 0 h, 0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ). Los basófilos rara vez se observan en los leucogramas de cetáceos, ya sea silvestres o bajo cuidado humano, como se indica en estudios sobre tursiones (*T. truncatus*, Medway y Geraci, 1964; Robinson *et al.*, 1969; Engelhardt, 1979; Shirai y Sakai, 1997; Fair *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2007; Venn-Watson *et al.*, 2007; Venn-Watson y Smith, 2011; Nouri-Shirazi *et al.*, 2017), delfín de costados blancos del Pacífico (*L. obliquidens*, Engelhardt, 1979; Shirai y Sakai, 1997), orca (*Orcinus orca*, Robinson *et al.*, 1969; Cornell, 1983), delfín de Risso (*Grampus griseus*, Shirai y Sakai, 1997), beluga (*Delphinapterus leucas*, Engelhardt, 1979; Cornell *et al.*, 1988; Williams III *et al.*, 1991; Saito *et al.*, 2018) y falsa orca (*P. crassidens*, Shirai y Sakai, 1997).

Se han reportado resultados similares en otras especies de mamíferos, incluyendo monos rhesus (*Macaca mulatta*), en los que se ha observado de 50 a 100 veces menos basófilos circulantes en comparación con humanos (de Weck, 1995). Los estudios en *H. sapiens* indican que, en condiciones basales, los basófilos comprenden el 0.5% de los leucocitos circulantes, mientras que este valor puede aumentar hasta 50% durante respuestas inmunológicas particulares (Gleich, 1989). Aunque los basófilos son los leucocitos observados con menor frecuencia en mamíferos, están involucrados en la disminución de la inflamación a través de la remoción de patógenos, en el control de las respuestas alérgicas a través de la producción de citosinas y han estado implicados en varias condiciones patológicas en *H. sapiens*, incluyendo el rechazo de órganos y enfermedades alérgicas (Geering *et al.*, 2013; Siracusa *et al.*, 2013).

En ausencia de LPS, se observaron disminuciones significativas en el número promedio de neutrófilos con respecto al tiempo de incubación en las muestras de *H. sapiens* y *T. truncatus gilli*, ya que se clasifican como células de vida corta que no pueden proliferar (Colotta *et al.*, 1992). Esta disminución en el número de neutrófilos es consistente con el reporte de que los neutrófilos de *H. sapiens* no estimulados *in vitro* tienen una vida media de 5 horas, lo cual es equivalente a la mitad de lo reportado para las poblaciones de neutrófilos *in vivo* (5-10 horas) (Lee *et al.*, 1993; Francischetti *et al.*, 2010). Del mismo modo, Colotta *et al.* (1992) informaron que hay una disminución progresiva en la viabilidad celular de las células polimorfonucleares humanas (CPHs) conforme al tiempo de incubación. En ausencia de LPS a las 0 y 24 h, el conteo promedio de neutrófilos fue ligeramente (1.7 veces,  $p = 0.53$ ) mayor en *T. truncatus gilli* en comparación con *H. sapiens* y fue significativamente (casi 39 veces,  $p = 0.028$ ) mayor a las 48 h. *T. truncatus* entra en ciclos de isquemia y reperfusión cada vez que bucea y, por lo tanto, es más probable que experimente hipoxia tisular en comparación con *H. sapiens*. Hannah *et al.* (1995) sugieren que la hipoxia actúa para inhibir la apoptosis de los neutrófilos. El mayor conteo de neutrófilos en *T. truncatus gilli* puede ser una respuesta adaptativa presente en los mamíferos marinos.

Cuando se expusieron los leucocitos a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), no se observaron diferencias significativas en los leucogramas entre *T. truncatus gilli* y *H. sapiens* a las 24 o 48 h. Sin embargo, hubo diferencias significativas dentro de cada especie. El número de neutrófilos fue mayor en las muestras de *H. sapiens* expuestas a LPS a las 24 y 48 h en comparación con las muestras en ausencia

de LPS; y en las muestras de *T. truncatus gilli* a las 48 h de incubación con LPS en comparación con aquellas mantenidas en ausencia de LPS. El aumento en el conteo de neutrófilos en muestras expuestas a LPS es consistente con otros estudios. Yamamoto *et al.* (1993) informaron que los neutrófilos de cobayo (*Cavia porcellus*) cultivados con LPS mostraron tasas significativamente reducidas de cariopincosis proporcional a la concentración de LPS después de una incubación por 24, 48 y 72 h, en comparación con los neutrófilos cultivados en ausencia de LPS. Sweeney *et al.* (1998) observaron disminuciones significativas dependientes de la dosis en la tasa (%) de apoptosis de CPHs expuestas a LPS de *E. coli* después de 24 h de incubación *in vitro*. En general, estos estudios sugieren que el LPS retrasa la apoptosis y, por lo tanto, contribuye a la eliminación del material patógeno a través de la extensión de la vida funcional de los neutrófilos (Lee *et al.*, 1993).

En leucocitos de *H. sapiens* incubados por 48 h con  $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$  de LPS, se observó más de dos veces la cantidad de eosinófilos en comparación con las muestras de *T. truncatus gilli*. Una posible explicación para esta diferencia deriva de la activación de eosinófilos mediada por LPS, el cual actúa como un estimulador para secretar factores reguladores, incluidas las citocinas inflamatorias, y a participar en fagocitosis en muestras de *H. sapiens* (Plötz *et al.*, 2001). Sokolova (2005) describe que los eosinófilos de *T. truncatus* son capaces de fagocitosis. Tener una mayor población de eosinófilos durante las respuestas proinflamatorias puede ser beneficioso para terminar la respuesta inmune.

Los perfiles inmunes y hematológicos están bajo control de muchos estimulantes. En ratones, la respuesta inflamatoria está bajo control genético; la endogamia resulta en cepas susceptibles (C3HeB/FeJ) y resistentes (C3H/HeJ), cuando es estimulada por los efectos inmunotóxicos de LPS de *Salmonella abortus* (Russo, 1980). Cornell (1983) observó que los ecotipos de *T. truncatus* de altamar mostraron un mayor valor de hemoglobina, hematocrito y glóbulos rojos en comparación con los ecotipos costeros, probablemente por diferencias en hábitat y dieta. Curiosamente, la hibridación entre estos dos ecotipos resultó en una lectura intermedia de estos valores hematológicos (Cornell, 1983).

Además, en orcas, *O. orca*, colectados del medio silvestre, los conteos totales de glóbulos blancos y eosinófilos fueron significativamente más altos durante su recolección en comparación con los valores obtenidos cuando están bajo cuidado humano, posteriores a su recolección, probablemente como resultado de la disminución de la carga de parásitos y el contacto con patógenos (Cornell, 1983). Se ha



observado que los valores hematológicos obtenidos de *T. truncatus* difieren entre los animales que han estado en ayunas y los animales que han sido alimentados antes de la extracción de sangre (Venn-Watson y Smith, 2011). Se encontró que *T. truncatus* mantenido bajo cuidado humano mostraron un conteo total de leucocitos más bajo y significativamente menos granulocitos en comparación con sus contrapartes silvestres (Nouri-Shirazi et al., 2017). Ruiz et al. (2009) reportaron que *T. truncatus* mantenido bajo cuidado humano en un sistema cerrado tuvieron un conteo de eosinófilos menor que el de los animales silvestres, mientras que una tercera población que se mantuvo bajo cuidado humano en una bahía abierta presentó un conteo intermedio. Los resultados observados con respecto al conteo diferencial y el conteo total de leucocitos de mamíferos marinos probablemente se deban a variaciones naturales entre individuos, genética, nutrición, ambiente, dieta y estilo de vida (Terasawa et al., 1999; McFarlane et al., 2001; Chmielewski et al., 2016). Es probable que estos factores, entre otros, también contribuyan a los cambios en el conteo diferencial cuando se exponen a un estímulo proinflamatorio, como LPS.

Numerosas restricciones éticas rodean la experimentación con inmunotoxinas en mamíferos marinos (Levin et al., 2007). Junto con la falta de disponibilidad general de los ensayos de función inmune (Ruiz et al., 2009), se han realizado pocos estudios sobre los cambios en la inmunidad innata con la edad (Venn-Watson y Smith, 2011) y existen menos estudios que analicen los efectos de LPS en mamíferos marinos. Hasta donde sabemos, no se han realizado estudios sobre posibles cambios en los conteos diferenciales en mamíferos marinos utilizando LPS como estimulante inmunitario. Como los mamíferos marinos y sus dietas se encuentran con frecuencia en ambientes contaminados, los estudios inmunológicos son cada vez más importantes y relevantes en el campo de la conservación.

### **8.3. Producción de radical superóxido en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

Las ERO son producidas por células inmunes durante el metabolismo normal del O<sub>2</sub>, durante la fagocitosis, y en respuesta a la reperfusión (Fridovich y Freeman, 1986; Mariscalco, 1993; Halliwell, 1999; Kevin et al., 2005). Durante el metabolismo normal, 1-4% del O<sub>2</sub> se reduce a ERO por medio de la ETC dentro de la membrana mitocondrial interna (Kevin et al., 2005). En *H. sapiens*, hay hasta una docena de mitocondrias distribuidas por el citoplasma de los leucocitos, lo que contribuye a la producción de ERO (Anderson, 1966). En los fagocitos, los complejos citosólicos y unidos a la

membrana celular de NADPH oxidasa producen ERO durante la destrucción de materiales extraños (Fridovich y Freeman, 1986; Babior, 1999; Itou *et al.*, 2001; Shiraishi *et al.*, 2002). Las respuestas inmunitarias del hospedero a materiales extraños varían en relación con la especie, los individuos (diferencias en la dieta, tasa metabólica, sexo, edad, entre otros), y el patógeno que se presenta, la dosis y los métodos de administración (por ejemplo, intravenoso, *in vitro*) (Lehmann *et al.*, 1987; McFarlane *et al.*, 2001; Copeland *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2011).

En este estudio, en condiciones control (ausencia de LPS), tanto a las 24 como a las 48 h, la producción de ERO fue evidente en los leucocitos de *H. sapiens* y *T. truncatus gilli*, probablemente asociados a procesos metabólicos naturales como la síntesis de ATP y la apoptosis celular (Geering *et al.*, 2013; Granger y Kvietys, 2015). Los neutrófilos circulantes no estimulados tienen una esperanza de vida de aproximadamente 90 h, después de lo cual, entran en proceso de apoptosis (Pillay *et al.*, 2010), lo que resulta en la producción de ERO. (Itou *et al.*, 2001). Después de 24 h en presencia de LPS (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), se registró una mayor producción de ERO (NS) en los leucocitos de *H. sapiens* en comparación con *T. truncatus gilli*. Estos resultados son similares a los reportados por Shiraishi *et al.* (2002), ya que los neutrófilos de *H. sapiens* y vacas Holstein (*Bos taurus*) incubados durante 30 minutos con LPS de *E. coli* mostraron una actividad respiratoria más alta a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ , en comparación con los neutrófilos de *T. truncatus*. Sin embargo, en este estudio, después de 48 h de exposición a LPS (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron una producción de ERO significativamente mayor en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Este resultado fue sorprendente, ya que se esperaba una respuesta inmune más fuerte al LPS, en forma de aumento de la producción de ERO a partir de los leucocitos de *H. sapiens*. Esto se basó en (1) estudios previos que sugirieron que *H. sapiens* muestra respuestas inmunes rápidas y fuertes cuando se expone a concentraciones bajas de LPS, en comparación con otras especies (Wolf, 1973; Ulevitch y Tobias, 1999; Guha y Mackman, 2001; de Vos *et al.*, 2009); (2) se observó una  $\text{LC}_{25}$  más baja en este estudio después de 48 h de exposición a LPS en los leucocitos de *H. sapiens* (6.968  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) en comparación con *T. truncatus gilli* (14.114  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) (sección 7.1), y (3) después de 48 h de exposición a LPS, observamos significativamente más eosinófilos y más (NS) neutrófilos y monocitos en *H. sapiens* en comparación con *T. truncatus gilli* (sección 7.2). No fue posible analizar el conteo diferencial de las alícuotas utilizadas para determinar la producción de ERO ya que los leucocitos son fijados para su observación. Es posible que la cantidad actual de fagocitos en esas alícuotas varíe entre

*H. sapiens* y *T. truncatus gilli* en relación con las alícuotas representativas (sección 7.2), lo que influye en la producción de ERO (Keogh *et al.*, 2011). Los fagocitos aumentan su ingesta de oxígeno durante el estallido respiratorio, lo que resulta en la producción de ERO a partir de una combinación de fagocitosis y metabolismo de O<sub>2</sub> mitocondrial (Sies y Cadenas, 1985; Keogh *et al.*, 2011). Con estos factores en mente, es posible que los leucocitos de *T. truncatus gilli* aumenten el metabolismo del O<sub>2</sub> en mayor grado, en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*, como un medio para terminar rápida y eficazmente las respuestas proinflamatorias iniciadas por LPS.

#### **8.4. Defensas antioxidantes en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

Las enzimas antioxidantes brindan defensa a las células y tejidos de mamíferos marinos y terrestres en respuesta a las ERO generadas a través del metabolismo normal dentro de las mitocondrias, ciclos de isquemia y reperfusión y la fagocitosis de invasores extraños (Fridovich y Freeman, 1986; Mariscalco, 1993; Halliwell, 1999; Kevin *et al.*, 2005). Los mamíferos marinos buceadores, como *T. truncatus*, enfrentan fluctuaciones más extremas en la disponibilidad de O<sub>2</sub>, en comparación con los mamíferos terrestres, como *H. sapiens*; los mamíferos marinos generalmente tienen mayores defensas bioquímicas en forma de antioxidantes en comparación con otras especies de mamíferos (Corsolini *et al.*, 2001). De manera similar, el aumento en las defensas antioxidantes es esencial para reducir la probabilidad de daño oxidativo inducido por eventos proinflamatorios (Marikovsky *et al.*, 2003).

En este estudio, observamos que los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron defensas antioxidantes significativamente más altas, con la excepción de SOD, tanto a las 24 como a las 48 h (en ausencia y presencia de LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>)), en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Estos resultados coinciden, en general, con el estudio de Wilhelm Filho *et al.* (2002), en el cual se reportó que los eritrocitos de varias especies de mamíferos marinos mostraron defensas antioxidantes más altas en comparación con varias especies de mamíferos terrestres (sección 2.3). Modificaciones en la expresión de las enzimas antioxidantes pueden ocurrir durante períodos de mayor producción de ERO (Halliwell y Gutteridge, 1999; Davies, 2000), incluyendo durante las respuestas proinflamatorias. Es probable que las diferencias en las defensas antioxidantes observadas en los leucocitos de *H. sapiens* y *T. truncatus gilli* después de una respuesta proinflamatoria sean representativas de las adaptaciones en la respuesta antioxidante en relación con cambios en las necesidades metabólicas (Sies, 1997). Este

concepto fue propuesto por Yam *et al.* (1978), quienes observaron un aumento significativo de los antioxidantes enzimáticos, incluidas SOD, GPx y GR, en los pulmones de *R. norvegicus domestica* neonatos después de la exposición a 96-98% de O<sub>2</sub> durante 24, 48 y 72 h, en comparación con los neonatos expuestos al aire atmosférico. De manera similar, después de la exposición a LPS de *E. coli*, las actividades antioxidantes de SOD, GR, y GST en el hígado de *M. musculus* cepa Balb/c aumentaron en 1.7, 1.5 y 1.8 veces, respectivamente, en comparación con los controles, como medio de reducir el daño oxidativo (Kurhaluk *et al.*, 2018). Después de 48 h de exposición a LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>), en este estudio, se encontró que los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron actividades de GST y GR significativamente mayores en comparación con 24 h y en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. En estas mismas condiciones, en comparación con 24 h, los leucocitos de *H. sapiens* mostraron actividades de GR y GST significativamente más altas, que corresponden con el aumento no significativo observado en la producción de ERO (sección 7.3). Estos resultados son similares a los reportados por Wilhelm Filho *et al.* (2002), quienes reportaron que los eritrocitos de mamíferos marinos mostraron, en promedio, 1.2 veces más actividad GST y 2.6 veces más actividad GR en comparación con varias especies de mamíferos terrestres. Así como GST cataliza la conjugación de GSH con electrófilos reactivos, como los grupos carbonilo, con fines de eliminación (Sies, 1997), es posible que los leucocitos de *T. truncatus gilli* muestran una mayor capacidad de eliminar grupos reactivos, en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Vázquez-Medina *et al.* (2007) reportaron actividades de GR y concentraciones de GSH significativamente mayores en tejidos de *P. hispida hispida* en comparación con tejidos de *S. scrofa domesticus*, indicando una mayor capacidad para reciclar GSH. Como GR cataliza la reposición de GSH a partir de GSSG (Sies, 1997), es posible que los leucocitos de *T. truncatus gilli* muestran una mayor capacidad para reciclar GSH en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*.

En general, los leucocitos de *H. sapiens* mostraron una mayor actividad de SOD en comparación con los leucocitos de *T. truncatus gilli*. Estos resultados difieren de los de Wilhelm Filho *et al.* (2002), quienes observaron que los eritrocitos de los mamíferos marinos muestran aproximadamente 5.5 veces más actividad de SOD en comparación con los mamíferos terrestres. En este estudio, después de 48 h de exposición a LPS (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>), se observó un aumento (NS) en la actividad de SOD, probablemente en relación con el aumento significativo en la producción de ERO (sección 7.3). Como la actividad de SOD no aumentó significativamente en relación con la producción de ERO en estas

condiciones, es posible que el desafío proinflamatorio no fue suficiente para influir significativamente en la actividad de SOD en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, o bien, que la actividad de SOD no aumente hasta que se haya alcanzado un umbral de producción de ERO.

Durante la destrucción de patógenos, los fagocitos producen ERO incluyendo  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Fridovich y Freeman, 1986). GPx y CAT actúan para reducir  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Kelly *et al.*, 1998). Sin embargo, la CAT muestra actividad principalmente durante los períodos de mayor producción de  $H_2O_2$ , cuando éste permea del sitio de producción (Baud *et al.*, 2004; Kevin *et al.*, 2005), como se puede observar en los sitios de inflamación (Burdon, 1995). Después de 48 h de incubación con LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de *H. sapiens* mostraron un aumento (NS) en la actividad tanto de GPx como de CAT, probablemente en relación con el aumento (NS) en la producción de ERO (sección 7.3). En contraste, los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron un aumento significativo tanto en la actividad de GPx como de CAT, probablemente en relación con el aumento significativo en la producción de ERO (sección 7.3). Estos resultados son similares a los reportados por Wilhelm Filho *et al.* (2002) quienes observaron aproximadamente 5.1 veces más actividad de GPx y 1.6 veces más actividad de CAT en los eritrocitos de varias especies de mamíferos marinos, en comparación con varias especies de mamíferos terrestres. Con base en los resultados de este estudio, es probable que los antioxidantes enzimáticos en los leucocitos de *T. truncatus gilli* contribuyan significativamente a la defensa contra ERO producidas durante una respuesta proinflamatoria, en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*.

### **8.5. Daño oxidativo en leucocitos de *Homo sapiens* y *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a lipopolisacáridos**

Los ácidos grasos (AG) constituyen hasta el 80% del peso de todos los lípidos de membrana en las membranas celulares de los mamíferos (Spector y Yorek, 1985; Delplanque y Jacotrot, 1987; Poggi *et al.*, 2015). Los AG insaturados son los más susceptibles a la peroxidación lipídica debido a la presencia de dobles enlaces (Fridovich y Freeman, 1986; Rustan y Drevon, 2005; Ayala *et al.*, 2014). Los leucocitos y otras células inmunes incorporan AG insaturados libres en sus membranas celulares, haciéndolos más susceptibles al daño oxidativo (Rustan y Drevon, 2005; Calder, 2008; Poggi *et al.*, 2015). Sin suficientes defensas antioxidantes, la formación de aldehídos después de la peroxidación lipídica puede resultar en daño a las proteínas unidas a las membranas y, por lo tanto, en la pérdida de la integridad, estructural y funcional, de las membranas (Ayala *et al.*, 2014).

En este estudio, después de 48 h de incubación con LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), se observó un aumento significativo en las concentraciones de TBARS en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, en comparación con 24 h. En estas condiciones, la producción de ERO fue significativamente mayor (sección 7.3) y la actividad antioxidante (sección 7.4) fue generalmente mayor en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, en comparación con los respectivos controles (48 h, ausencia de LPS). Estos resultados son consistentes con lo reportado en otros estudios. Tras una inyección IP de  $100 \mu\text{g}$  de LPS  $100 \text{ g}^{-1}$  de peso corporal en *M. auratus*, las concentraciones séricas de TBARS aumentaron en un 83% después de 48 h (Memon *et al.*, 2000; sección 2.4). En este estudio, después de 48 h de exposición a LPS, los leucocitos de *T. truncatus gilli* también mostraron una concentración de TBARS significativamente mayor en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Estos resultados difieren de los reportados por Wilhelm Filho *et al.* (2002), ya que el suero de varias especies de mamíferos terrestres mostró una concentración de TBARS 3.3 veces mayor que la de varias especies de mamíferos marinos (sección 2.4). Dentro de este estudio, las concentraciones más altas de TBARS observadas en los leucocitos de *T. truncatus gilli* después de 48 h de exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), probablemente ocurrieron en relación con el aumento significativo en la producción de ERO (sección 7.3) en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Por lo tanto, es probable que el daño oxidativo a lípidos observado en los leucocitos de *T. truncatus gilli* ocurriera en respuesta a la producción de ERO, inducida por fagocitosis, como medio para terminar la respuesta proinflamatoria.

Después de la exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) durante 24 h, los leucocitos de *H. sapiens* mostraron una concentración de TBARS significativamente mayor en comparación con aquellos en ausencia de LPS, y en comparación con los leucocitos de *T. truncatus gilli* (en ausencia y presencia de LPS).

Después de 48 h de incubación en ausencia de LPS, los leucocitos de *H. sapiens* mostraron una concentración de TBARS significativamente mayor en comparación con la presencia de LPS, así como en comparación con los leucocitos de *T. truncatus gilli* (en ausencia y presencia de LPS). En los leucocitos de *H. sapiens*, de 96 observaciones (12 individuos, 4 tratamientos por duplicado), 83 (86%) estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo, mientras que en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, de 96 observaciones (12 individuos, 4 tratamientos por duplicado), 96 (100%) estaban por debajo del límite de detección. Es posible que otros factores, como las diferencias en la dieta o en el contenido

de lípidos en cada población de leucocitos, entre especies impulsen estos resultados. Para garantizar la precisión, se sugiere que se repita el ensayo.

En general, los leucocitos de *H. sapiens* mostraron concentraciones más altas de carbonilos proteicos en comparación con los leucocitos de *T. truncatus gilli*. Esta diferencia se observó en condiciones control (ausencia de LPS), a las 24 y 48 h, así como después de la exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) durante 24 y 48 h. Se han reportado anteriormente resultados similares. Se reportaron en músculo esquelético de *M. angustirostris* concentraciones de carbonilos proteicos ligeramente más bajas (NS) en los controles después de la incubación durante 1, 6 y 12 h, en comparación con los músculos de *H. sapiens* (Del-Águila-Vargas *et al.*, 2019). En este estudio, después de 24 y 48 h de exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron defensas antioxidantes más altas (sección 7.4), lo que probablemente contribuyó al menor daño oxidativo a proteínas observado, en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Los mamíferos marinos experimentan fluctuaciones drásticas en la disponibilidad de  $\text{O}_2$  durante de la respuesta al buceo. Para resistir estas condiciones, los mamíferos marinos generalmente tienen mayores concentraciones de proteínas de unión a  $\text{O}_2$  (hemoglobina, mioglobina) y mayores defensas antioxidantes, en comparación con los mamíferos terrestres (Thorson y Le Boeuf, 1994; Kooyman y Ponganis, 1998; Corsolini *et al.*, 2001; Wilhelm Filho *et al.*, 2002; Ponganis *et al.*, 2003; Meir *et al.*, 2009). Es posible que estas adaptaciones también proporcionen apoyo a los leucocitos de los mamíferos marinos durante las respuestas proinflamatorias, como un medio para reducir el daño oxidativo.

#### **8.6. Conteo diferencial de leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez**

No se observaron diferencias significativas en los leucogramas de *T. truncatus gilli* entre sexos. No se observaron diferencias significativas en los leucogramas de *T. truncatus gilli* entre estadios de madurez. Las posibles correlaciones entre el conteo total de leucocitos, el sexo y el estadio de madurez se han analizado en elefantes marinos del norte (*M. angustirostris*), beluga (*D. leucas*) y orca (*O. orca*). Cornell (1983) sugirió que el sexo no es un determinante del conteo total de glóbulos blancos en orcas, *O. orca* clínicamente sanas mantenidas bajo cuidado humano; sin embargo, reportó disminuciones en el conteo total de leucocitos con la edad. En el caso de belugas, *D. leucas*, clínicamente sanas, mantenidas bajo cuidado humano, el sexo y el estadio de madurez (juvenil y adulto) no se consideraron factores

significativos en el conteo total de leucocitos (Cornell *et al.*, 1988). Del mismo modo, la edad y el sexo no se consideraron condicionantes significativas de leucocitosis (número de leucocitos arriba del límite superior) en cachorros (1-6 meses de edad) de *M. angustirostris* rescatados, al comparar con animales clínicamente sanos, con animales clínicamente sanos excepto por una leucocitosis moderada a marcada, y con animales clínicamente anormales con leucocitosis moderada a marcada (Goldstein *et al.*, 1998). Al analizar las diferencias en los leucogramas con respecto a la edad y el estadio de madurez, numerosos estudios han encontrado resultados similares a los reportados en este estudio; sin embargo, también se han reportado resultados discrepantes. Fair *et al.* (2006) no observaron diferencias significativas en los leucogramas entre sexos en *T. truncatus*, pero reportaron que los adultos mostraron conteos de neutrófilos absolutos significativamente más altos en comparación con los juveniles. Venn-Watson *et al.* (2007) reportaron que *T. truncatus* hembras mostraron 1.4 veces más linfocitos y 1.3 veces más eosinófilos en comparación con los machos. *T. truncatus* entre 5-10 años de edad mostraron 1.0 veces menos neutrófilos, 1.5 veces más linfocitos, y 1.1 veces más eosinófilos, en comparación con *T. truncatus* entre 10-30 años de edad (Venn-Watson *et al.*, 2007). Keogh *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas entre sexos en los conteos diferenciales de lobos marinos de Steller (*Eumetopias jubatus*); sin embargo, se observaron disminuciones relacionadas con la edad en los conteos de neutrófilos.

Venn-Watson y Smith (2011) no observaron diferencias significativas entre las clases de edad en el conteo total de linfocitos, monocitos, eosinófilos o basófilos en *T. truncatus*; sin embargo, observaron aumentos significativos en el conteo total de neutrófilos con la edad. En *H. sapiens* se reportó que el conteo de linfocitos puede cambiar con la edad como resultado de cambios progresivos en la inmunidad, aunque no siempre se observan diferencias entre hombres y mujeres (MacKinney Jr, 1978; Veneri *et al.*, 2007; Chmielewski *et al.*, 2016).

#### **8.6.1. Producción de radical superóxido en leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez**

El sexo aparentemente no es una variable determinante en la producción de ERO en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, ya que sólo se observaron diferencias significativas entre machos y hembras después de 48 h de exposición a LPS. En estas condiciones, en los leucocitos de los machos se observó una producción de ERO 2 veces mayor en comparación con las hembras. Los resultados de este estudio son



similares a informes anteriores en cetáceos y mamíferos terrestres. En los leucocitos de *D. leucas*, se observó en los machos un estallido respiratorio aproximadamente 10 veces mayor en presencia de acetato de miristato de forbol (MFA), en comparación con las hembras (de Guise *et al.*, 1995). De manera similar, se encontró que las mitocondrias del hígado de ratas Wistar (*M. musculus*) machos producen 40% más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con las hembras (Borrás *et al.*, 2003). Los factores ambientales pueden afectar la función inmunológica (Calder, 2008). En Cabo Dolphins, los factores ambientales como la filtración del agua, la temperatura, la salinidad, entre otros, son monitoreados y mantenidos constantes; es probable que otros factores puedan estar asociados a las diferencias en la producción de ERO observadas entre sexos después de 48 h de exposición a LPS en este estudio. Las diferencias en el contenido de fagocitos podrían ser un factor contribuyente. Dentro de las muestras analizadas, los machos tuvieron aumentos (NS) en los conteos de neutrófilos y monocitos en comparación con las hembras. Como se mencionó anteriormente (sección 8.3), no se realizó el conteo diferencial de las alícuotas sometidas a análisis para la producción de ERO. Por lo tanto, es posible que, en estas alícuotas, hubiese más fagocitos en los machos, contribuyendo a una mayor producción de ERO en comparación con las hembras. Otros factores que podrían explicar estas diferencias entre sexos incluyen las diferentes capacidades de producción de ERO entre las poblaciones de leucocitos y las diferencias en el metabolismo, perfil hormonal, dieta, o capacidad de respuesta inmune entre individuos (McFarlane *et al.*, 2001; Kew *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2011).

El estadio de madurez, en este estudio, aparentemente no fue un factor que contribuyó a la producción de ERO en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, ya que no se observaron diferencias significativas entre los tursiones inmaduros y maduros. Al analizar el conteo diferencial (sección 7.6.1), no se observaron diferencias significativas en los conteos de fagocitos entre estadios de madurez. Los resultados de este estudio son similares a los reportados por Wenisch *et al.* (2000), quienes no encontraron diferencias significativas en el estallido respiratorio (producción de ERO) en los neutrófilos entre *H. sapiens* reproductivamente maduros (22-36 años de edad), premenopáusicos o menopáusicos (38-56 años de edad) y senescentes (62-83 años de edad) cuando fueron expuestos a *E. coli*. Además, al exponer los leucocitos de *D. leucas* a MFA, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de fagocitosis y el estallido respiratorio entre animales inmaduros y maduros (de Guise *et al.*, 2005).

### 8.6.2. Actividad enzimática en leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez

El sexo aparentemente no fue una variable determinante en la actividad antioxidante enzimática en los leucocitos de *T. truncatus gilli* en respuesta a la exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), ya que sólo se observaron diferencias significativas en la actividad de GST entre machos y hembras después de 48 h de exposición a LPS. En estas condiciones, los leucocitos de machos mostraron una actividad de GST significativamente mayor, mientras que las actividades de SOD, CAT, GPx, y GR fueron sólo ligeramente superiores (NS) en comparación con las hembras. Estos resultados difieren de lo reportado por Borrás *et al.* (2003), quienes observaron que las mitocondrias de *M. musculus* hembras mostraron actividades de GPx y Mn-SOD significativamente más altas ( $> 2$  veces), en comparación con los machos. En este estudio, el aumento de las defensas antioxidantes en los leucocitos de *T. truncatus gilli* machos probablemente ocurrió en relación con el aumento significativo en la producción de ERO (sección 7.6.2) observado después de 48 h de exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ).

No se consideró que el estadio de madurez fuera un factor contribuyente en la actividad de las enzimas antioxidantes en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, ya que sólo se observaron diferencias significativas en la actividad de SOD después de 48 h en ausencia de LPS. Después de 48 h de exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de animales maduros mostraron actividades generalmente más altas (NS) de SOD, CAT, y GST, probablemente en relación con el ligero incremento (NS) en la producción de ERO (sección 7.6.2) observado en comparación con los leucocitos de *T. truncatus gilli* inmaduros. Al analizar ratones macho endogámicos de la línea C57BL/6J, se observó que los eritrocitos de ratones jóvenes (1 mes) mostraron aproximadamente 1.2 veces más actividad de SOD, 1.3 veces más actividad de GPx y 2 veces más actividad de CAT en comparación con ratones mayores (16 meses) (Woźniak *et al.*, 2004). En *H. sapiens*, los eritrocitos de grupos jóvenes (20-32 años) mostraron 2.6 veces más actividad de CAT en comparación con los grupos senescentes (60-75 años) (Prashant *et al.*, 2007). En los eritrocitos de camellos (*Camelus dromedaries*) inmaduros (9 meses) no se observaron diferencias significativas en la actividad de SOD en comparación con los animales maduros (12 meses), mientras que los animales maduros mostraron 1.2 veces más actividad de GPx y 1.3 veces más actividad de CAT en comparación con animales inmaduros (Mousa *et al.*, 2006). Por lo tanto, parece que las defensas antioxidantes en relación con el estadio de madurez dependen de cada especie, antioxidante, y

tejido que se examinan, las etapas de vida extremas (recién nacidos frente a senescentes), y las condiciones ambientales.

### **8.6.3. Daño oxidativo en leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en respuesta a la exposición a lipopolisacáridos por sexo y estadio de madurez**

El sexo no se consideró un factor significativo que afectara la peroxidación lipídica en los leucocitos de *T. truncatus gilli* durante la respuesta proinflamatoria, ya que sólo se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en ausencia de LPS después de 24 h de incubación. En estas condiciones, los leucocitos de las hembras mostraron concentraciones de TBARS 1.3 veces mayores en comparación con los leucocitos de los machos. En contraste con este estudio, Pansarasa *et al.* (2000) reportaron que los músculos esqueléticos de los hombres (*H. sapiens*) entre las edades de 17-40 años mostraban una peroxidación lipídica aproximadamente 1.9 veces mayor, en comparación con las mujeres. En este estudio, los leucocitos de *T. truncatus gilli* hembras después de 24 h de incubación en ausencia de LPS mostraron una producción de ERO ligeramente menor (NS) (sección 7.6.2), y defensas antioxidantes generalmente más altas (sección 7.6.3), en comparación con los machos.

Después de 48 h de incubación con LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), no se observaron diferencias significativas entre sexos en relación con la peroxidación lipídica. Los resultados de este estudio son similares a los reportados por Šverko *et al.* (2004) quienes no observaron diferencias entre sexos en los niveles de peroxidación lipídica en hígados de ratones hembra CBA de 1 y 10 meses de edad. De manera similar, Pansarasa *et al.* (2000) no reportaron diferencias en la peroxidación de lípidos de músculo esquelético entre sexos en *H. sapiens*.

El estadio de madurez aparentemente no fue un factor significativo que contribuya a la peroxidación lipídica en los leucocitos de *T. truncatus gilli* expuestos a LPS, ya que sólo se observaron diferencias significativas entre tursiones inmaduros y maduros en ausencia de LPS después de 48 h de incubación.

En estas condiciones, los leucocitos de tursiones maduros mostraron una producción de ERO similar (NS) (sección 7.6.2) y, en general, menos defensas antioxidantes (sección 7.6.3) en comparación con los leucocitos de tursiones inmaduros. Después de 48 h de exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de tursiones inmaduros y maduros mostraron concentraciones similares (NS) de TBARS.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Mousa *et al.* (2006) quienes no reportaron diferencias en la peroxidación de lípidos en los eritrocitos de *C. dromedarius* maduros e inmaduros. Sin embargo, otras investigaciones reportan resultados diferentes. En un estudio de Woźniak *et al.* (2004), los eritrocitos de los ratones maduros de la línea C57BL/6J (16 meses) mostraron 3 veces más peroxidación lipídica en comparación con los ratones inmaduros (1 mes). Los eritrocitos de *H. sapiens* senescente (60-75 años) mostraron 1.1 veces más peroxidación lipídica en comparación con los individuos sexualmente maduros (23-32 años) (Prashant *et al.*, 2007).

El sexo aparentemente no fue un factor significativo que afectara el daño oxidativo a proteínas en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, ya que no se observaron diferencias significativas en los niveles de carbonilos proteicos entre los leucocitos de tursiones machos y hembras. Valle *et al.* (2007) no reportaron diferencias relacionadas con el sexo en la concentración de carbonilos proteicos en las mitocondrias hepáticas de *M. musculus*. No se reportaron diferencias relacionadas con el sexo en las concentraciones de carbonilos proteicos en músculo esquelético de *H. sapiens* joven (17-40 años), adulto (41-65 años) o de edad avanzada (66-91 años) (Pansarasa *et al.*, 2000).

El estadio de madurez aparentemente no fue un factor significativo que contribuya al daño oxidativo a proteínas en los leucocitos de *T. truncatus gilli* en respuesta a la exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), ya que no se observaron diferencias significativas. Similar a este estudio, Campbell *et al.* (2014) no reportaron diferencias relacionadas con la edad en las concentraciones de carbonilos proteicos en los cerebros de ratones de la cepa CB6F1 después de la exposición a LPS de *E. coli*; aunque los animales jóvenes (4.5 meses) mostraron más carbonilos proteicos (NS) en comparación con los animales mayores (26.5 meses). En este estudio, después de 48 h exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de tursiones inmaduros mostraron una concentración ligeramente mayor (NS) de carbonilos proteicos en comparación con los animales maduros. Noren *et al.* (2004) reportaron que las crías de *T. truncatus gilli* (menos de 3.4 años) pudieron bajar su frecuencia cardíaca a 42 latidos por minuto durante la respuesta al buceo, mientras que los animales más viejos (más de 3.4 años) pudieron disminuir su frecuencia cardíaca a 24-30 latidos por minuto. Peddemors (1990) reportó que alrededor de los 6 meses de edad, *Tursiops spp.* crías aumentaron significativamente su capacidad para contener la respiración entre 90 y 150 segundos. En este estudio, después de 48 h de incubación con LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), los leucocitos de tursiones maduros mostraron una producción de ERO ligeramente mayor

(NS) (sección 7.6.2) y defensas antioxidantes generalmente más altas (sección 7.6.3), probablemente contribuyendo a la concentración de carbonilos proteicos ligeramente más baja (NS), en comparación con los leucocitos de tursiones inmaduros. Por lo tanto, como se reporta que la respuesta al buceo y las defensas antioxidantes mejoran con la edad, el mayor contenido de carbonilos proteicos (NS) observado, en este estudio, en los leucocitos de tursiones inmaduros en comparación con los leucocitos de tursiones maduros, podría estar relacionado con adaptaciones relacionadas con la edad.

## 9. CONCLUSIONES

En este estudio, los leucocitos de *H. sapiens* y *T. truncatus gilli* se incubaron *in vitro* en ausencia y presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) durante 24 y 48 h. Los indicadores de estrés oxidativo se analizaron en cada tratamiento y se compararon entre especies, sexo (*T. truncatus gilli*), y estadio de madurez (*T. truncatus gilli*). Para ambas especies, como se reportó en estudios anteriores, la exposición a LPS activó la respuesta inmune. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que determina la LC o LD en mamíferos marinos después de una exposición a LPS. En estudios previos se reportó que la LC y la LD en mamíferos terrestres varían con la especie, el tejido o línea celular analizada, así como con la cepa de LPS utilizada.

Después de 48 h de exposición a LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ), en los leucocitos de *T. truncatus gilli* aumentó significativamente la producción de ERO, pero éstos tuvieron menor daño oxidativo, en forma de carbonilos proteicos, en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. El menor daño oxidativo en los leucocitos de *T. truncatus gilli* podría deberse a una mayor actividad enzimática antioxidante en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las mayores defensas antioxidantes proporcionan a los tejidos de mamíferos marinos una protección adicional contra situaciones que propician estrés oxidativo, como la inflamación, en comparación con los tejidos de mamíferos terrestres. El sexo y el grupo de edad no se consideraron factores que afecten a la respuesta inmune después de un reto proinflamatorio en los leucocitos de *T. truncatus gilli*.

Después de 48 h de incubación, la  $LC_{25}$  de LPS en los leucocitos de *H. sapiens* se determinó como  $6.968 \mu\text{g de LPS mL}^{-1}$ , mientras que en los leucocitos de *T. truncatus gilli*, la  $LC_{25}$  de LPS se determinó como  $14.114 \mu\text{g de LPS mL}^{-1}$ . Aunque la  $LC_{25}$  de los leucocitos de *T. truncatus gilli* fue mayor que la de los leucocitos de *H. sapiens* después de 48 h de exposición a LPS, los leucocitos de *T. truncatus gilli* mostraron una mayor respuesta (aproximadamente 1.9 veces más producción de ERO, 7.9 veces más actividad de CAT, 2.1 veces más actividad de GPx, 11.1 veces más actividad de GR, y 3.2 veces más actividad de GST), en comparación con los leucocitos de *H. sapiens*.

En los mamíferos, el letargo es un síntoma común cuando se experimenta una respuesta proinflamatoria. Sin embargo, a diferencia de *H. sapiens* y los mamíferos marinos anfibios, como los pinnípedos, los cetáceos no pueden recuperarse en tierra. La capacidad reducida de los cetáceos

letárgicos para escapar de predadores, como los tiburones, conduce a una mayor posibilidad de depredación. En casos como éstos, la rápida terminación de la respuesta proinflamatoria puede considerarse una ventaja evolutiva. Los resultados de este estudio podrían tomarse para sugerir que los sistemas inmunológicos de los mamíferos marinos son más adecuados para la terminación eficiente de las respuestas proinflamatorias en comparación con sus contrapartes terrestres.

### 9.1. Preguntas sin respuesta (nueva frontera)

Nuestro conocimiento sobre el sistema inmunológico y los mecanismos de la respuesta inmune en mamíferos marinos, especialmente cetáceos, es limitado (de Guise *et al.*, 1995; Beineke *et al.*, 2010; Bossart *et al.*, 2019). Para comprender mejor la respuesta inmune y cómo influye en las condiciones de estrés oxidativo, existen muchas posibilidades para estudios futuros. Las posibilidades incluyen lo siguiente.

1) Una de las limitaciones de este estudio es que los indicadores de estrés oxidativo en los leucocitos de *T. truncatus gilli* y *H. sapiens* sólo se midieron tras 24 y 48 h de incubación en ausencia o presencia de LPS ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ). Como estos indicadores no se determinaron después de una exposición a corto plazo a LPS, se desconocen los cambios en la respuesta inmune que conducen al reto proinflamatorio. Los estudios futuros podrían replicar nuestra metodología utilizando varias concentraciones de LPS por encima y por debajo de la  $LC_{25}$  para cada especie. Asimismo, se recomienda determinar los indicadores de estrés oxidativo cada hora hasta las 48 h de exposición a LPS. Esto proporcionaría información sobre las respuestas a corto y largo plazo durante diferentes grados de una respuesta proinflamatoria.

2) Este estudio se limitó a análisis *in vitro* y no se pudo determinar la sensibilidad de la respuesta inmune después de un reto proinflamatorio con LPS. Estudios previos han sugerido que *H. sapiens* representa el modelo más sensible a la exposición a LPS, ya que sus respuestas fisiológicas (cambios de temperatura, presión arterial, frecuencia cardíaca, reclutamiento de células inmunes, entre otros), ocurren rápidamente después de la exposición a pequeñas dosis de LPS (Wolff, 1973). Sin embargo, estos estudios comparativos no han incluido mamíferos marinos como modelo. Estudios futuros también podrían determinar la producción de factores inmunes, como las citocinas, después de un reto

proinflamatorio como un medio para comparar la sensibilidad inmune entre mamíferos terrestres y marinos.

3) La dieta afecta las respuestas inmunes ya que las células inmunes, como los leucocitos, son capaces de captar e incorporar AG libres de la dieta en sus membranas celulares (Rustan y Drevon, 2005; Calder, 2008; Poggi *et al.*, 2015). Los mamíferos marinos, como *T. truncatus*, consumen grandes cantidades de peces grasos y, por tanto, AGs poliinsaturados  $\Omega$ -3 (Pham-Huy *et al.*, 2008; Calder, 2015). A su vez, los AG insaturados en las membranas celulares son más propensos a la oxidación, en comparación con los AG saturados, lo que coloca a estas células en un mayor riesgo de estrés oxidativo (Fridovich y Freeman, 1986; Rustan y Drevon, 2005; Ayala *et al.*, 2014). Los estudios futuros podrían analizar el contenido de AG de los leucocitos en los mamíferos marinos para determinar cómo la dieta, así como los suplementos vitamínicos, pueden afectar el daño oxidativo durante la respuesta proinflamatoria.

4) Se ha sugerido que los tursiones silvestres tienen un sistema inmunológico más regulado en comparación con las que se mantienen bajo el cuidado humano (Fair *et al.*, 2017). Como este estudio se realizó utilizando leucocitos de *T. truncatus gilli* mantenidos bajo cuidado humano en condiciones cerradas (sistemas de agua estrechamente controlados, cargas parasitarias reducidas/ausentes, exposición reducida a patógenos), es posible que los indicadores de estrés oxidativo después de un reto proinflamatorio difieran en animales silvestres. Los estudios futuros deben tener como objetivo replicar este estudio utilizando leucocitos de tursiones libres para comparar con estos resultados.

5) Los mecanismos de la respuesta inmune, como las vías de señalización, las interacciones entre células y las funciones de ciertas células inmunes, como los basófilos, particularmente en mamíferos marinos, son poco conocidas. Los estudios futuros podrían enfocarse en investigaciones detalladas de estos temas, para permitir una mejor comprensión de la respuesta inmune durante los retos proinflamatorios.



## 10. LITERATURA CITADA

- Abele, D., E. Philipp., P. M. Gonzalez., S. Puntarulo. 2007. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Frontiers in Bioscience*. 12: 933-946.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. En: Packer, L. (ed.). *Methods in enzymology, Oxygen radicals in biological systems*. Editorial Packer. 105. Estados Unidos de América. pp. 121-126.
- Allen, K. N., J. P. Vázquez-Medina. 2019. Natural tolerance to ischemia and hypoxemia in diving mammals: a review. *Front. Physiol.* 10: 1-10.
- Anderson, D. R. 1966. Ultrastructure of normal and leukemic leukocytes in human peripheral blood. *J. Ultra Mol. Struct. R.* 1: 5-42.
- Arnetz, B. 2016. Complete blood count: absolute or relative values? *J. Hematol.* 5(1): 49-53.
- Arya, P. D., M. L. Joseph., A. Mathew. 2018. Determination of LC<sub>50</sub> of lead acetate for a fish *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 6(6): 180-182.
- Ayala, A., M. F. Muñoz., S. Argüelles. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014: 1-31.
- Babior, B. M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 93(5): 1464-1476.
- Baird, R. W. 2005. Sights of dwarf (*Kogia sima*) and pygmy (*K. breviceps*) sperm whales from the main Hawaiian islands. *Pac. Sci.* 59(3): 461-466.
- Baud, O., A. E. Greene., J. Li., H. Wang., J. J. Volpe., P. A. Rosenberg. 2004. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 24(7): 1531-1540.
- Beineke, A., U. Siebert., P. Wohlsein., W. Baumgärtner. 2010. Immunology of whales and dolphins. *Vet. Immunol. Immunop.* 133: 81-94.
- Ben-Shaul, V., L. Lomnitski., A. Nyska., Y. Zurovsky., M. Bergman., S. Grossman. 2001. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicol. Lett.* 123: 1-10.
- Bikard, D., L. A. Marraffini. 2012. Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 15-20.
- Birben, E., U. M. Sahiner., C. Sackesen., S. Erzurum., O. Kalayci. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal.* 5: 9-19.
- Bloom, P., M. Jager. 1994. The injury and subsequent healing of a serious propeller strike to a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) resident in cold waters off the Northumberland coast of England. *Aquatic Mammals.* 20(2): 59-64.

- Borrás, C., J. Sastre., D. García-Sala., A. Lloret., F. V. Pallardó., J. Viña. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Bio. Med.* 34(5): 546-552.
- Bossart, G. D., T. A. Romano., M. M. Peden-Adams., A. M. Schaefer., C. D. Rice., P. A. Fair., J. S. Reif. 2019. Comparative innate and adaptive immune responses in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with viral, bacterial, and fungal infections. *Front. Immunol.* 10: 1-15.
- Boyd, C. E. 2005. LC<sub>50</sub> calculations help predict toxicity. *GAA.* 84-87.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breese, D., B. R. Tershy. 1993. Relative abundance of cetacea in the Canal de Ballenas, Gulf of California. *Mar. Mammal Sci.* 9(3): 319-324.
- Buck, J. D., N. A. Overstrom., G. W. Patton., H. F. Anderson., J. F. Gorzelany. 1991. Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf coasts. *Dis. Aquat. Org.* 10: 147-152.
- Burdon, R. H. 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Bio. Med.* 18(4): 775-794.
- Calder, P. C. 2008. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostag. Leukotr. Ess.* 79: 101-108.
- Calder, P. C. 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1851: 469-484.
- Cantú-Medellín, N., B. Byrd., A. Hohn., J. P. Vásquez-Medina., T. Zenteno-Savín. 2011. Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers. *Comp. Biochem. Phys. A.* 158: 438-443.
- Carrillo-Casas, E. M., Z. Suástegui-Urquijo., S. Arroyo-Escalante., R. Morales-Espinosa., D. Moncada-Barrón., L. Hernández-Delgado., J. L. Méndez-Sánchez., G. Delgado-Sapién., A. Navarro-Ocaña., Á. Manjarrez-Hernández., J. Xicohtencatl-Cortes., R. Hernández-Castro. 2013. *E. coli* outbreak in a neonate intensive care unit in a general hospital in Mexico City. *Folia Microbiol.* 58: 229-234.
- Carlberg, I., B. Mannervik. 1985. Glutathione reductase. *Method. Enzymol.* 113: 484-490.
- Caroff, M., D. Karibian., J. Cavaillon., N. Haeffner-Cavaillon. 2002. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4: 915-926.
- Campbell, A., E. Sharman., S. C. Bondy. 2014. Age-related differences in the response of the brain to dietary melatonin. *Age.* 36: 49-55.
- Cherifi, A., M. Contrepolis., B. Picard., P. Gouillet., J. de Rycke., J. Fairbrother., J. Barnouin. 1990. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 279-284.

- Chmielewski, P. P., K. Borysławski., K. Chmielowiec., J. Chmielowiec., B. Strzelec. 2016. The association between total leukocyte count and longevity: evidence from longitudinal and cross-sectional data. *Ann. Anat.* 204: 1-10.
- Chuang, C., T. Chen., Y. Cherng., Y. Tai., T. Chen., R. Chen. 2011. Lipopolysaccharide induces apoptotic insults to human alveolar epithelial A549 cells through reactive oxygen species-mediated activation of an intrinsic mitochondrion-dependent pathway. *Arch. Toxicol.* 85: 209-218.
- Clopper, C. J., E. S. Pearson. 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika.* 26(4): 404-413.
- Cocuzza, M., S. C. Sikka., K. S. Athayde., A. Agarwal. 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int. Braz. J. Urol.* 33(5): 603-621.
- Colotta, F., F. Re., N. Polentarutti., S. Sozzani., A. Mantovani. 1992. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 80(8): 2012-2020.
- Copeland, S., H. S. Warren., S. F. Lowry., S. E. Calvano., D. Remick., Inflammation and the Host Response to Injury Investigators. 2005. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 12(1): 60-67.
- Corkeron, P. J., R. J. Morris., M. M. Bryden. 1987. A note on healing of large wounds in bottle dolphins, *Tursiops truncatus*. *Aquat. Mamm.* 13(3): 96-98.
- Cornell, L. H. 1983. Hematology and clinical chemistry values in the Killer Whale, *Orcinus orca*. *J. Wildlife Dis.* 19(3): 259-264.
- Cornell, L. H., D. S. Duffield., B. E. Joseph., B. Stark. 1988. Hematology and serum chemistry values in the Beluga (*Delphinapterus leucas*). *J. Wildlife Dis.* 24(2): 220-224.
- Corsolini, S., M. Nigro., S. Olmastroni., S. Focardi., F. Regoli. 2001. Susceptibility to oxidative stress in Adélie and emperor penguin. *Polar Biol.* 24: 365-368.
- Darr, D., I. Fridovich. 1995. Adaptation to oxidative stress in young, but not in mature or old, *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Bio. Med.* 18(2): 195-201.
- Davies, K. J. A. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair and replacement systems. *Life* 50: 279-289.
- Davis, A. K., D. L. Maney., J. C. Maerz. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22: 760-772.
- Delplanque, B., Jacotot, B. 1987. Influence of environmental medium on fatty acid composition of human cells: leukocytes and fibroblasts. *Lipids.* 22(4): 241-249.
- de Guise, S., D. Flipo., J. R. Boehm., D. Martineau., P. Béland., M. Fournier. 1995. Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunop.* 47: 351-362.

- de Vos, A. F., J. M. Pater., P. S. van den Pangaart., M. D. de Kruif., C. vañt Veer., T. van der Poll. 2009. *In vivo* lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands. *J. Immunol.* 183: 533-542.
- de Weck, A. L. 1995. What can we learn from the allergic zoo? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 13-18.
- Del-Águila-Vargas, A. C., J. P. Vázquez-Medina., D. E. Corcker., L. C. Méndez-Rodríguez., R. Gaxiola-Robles., J. A. de Anda-Montañez., L. J. Ramirez-Jirano., O. Lugo-Lugo., T. Zenteno-Savín. 2019. Antioxidant response to cadmium exposure in the primary skeletal muscle cells isolated from humans and elephant seals. *Comp. Biochem. Phys. C.* <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108641>.
- Desforges, J. W., C. Sonne., M. Levin., U. Siebert., S. de Guise., R. Dietz. 2016. Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environ. Int.* 86: 126-139.
- Dierauf, L. A., Gulland, F. M. D. 2001. *CRC handbook of marine mammal medicine*. Editorial Dierauf y Gulland. Segunda Edición. Boca Raton, Estados Unidos de América. 1120p.
- Dietz, R., M. P. Heide-Jorgensen., T. Harkonen. 1989. Mass deaths of Harbor seals (*Phoca vitulina*) in Europe. *Ambio.* 18: 258-264.
- Drossos, G., A. Lazou., P. Panagopoulos., S. Westaby. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* 59: 169-172.
- Drouin, G., J. Godin., B. Pagé. 2011. The genetics of Vitamin C loss in vertebrates. *Curr. Genomics.* 12: 371-378.
- Elsner, R., D. D. Hammond., H. R. Parker. 1969. Circulatory responses to asphyxia in pregnant and fetal animals: a comparative study of weddell seals and sheep. *Yale J. Biol. Med.* 42(3-4): 202-217.
- Elsner, R., S. Øyasæter., R. Almaas., O. D. Saugstad. 1998. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. *Comp. Biochem. Phys. A.* 119: 975-980.
- Engelhardt, F. R. 1979. Haematology and plasma chemistry of captive pinnipeds and cetaceans. *Aquat. Mamm.* 7: 11-20.
- Fair, P. A., A. M. Schaefer., D. S. Houser., G. D. Bossart., T. A. Romano., C. D. Champagne., J. L. Stott., C. D. Rice., N. White., J. S. Reif. 2017. The environment as a drive of immune and endocrine responses in dolphins (*Tursiops truncatus*). *PLoS ONE.* 12(5): 1-19.
- Fair, P. A., T. C. Hulsey., R. A. Varela., J. D. Goldstein., J. Adams., E. S. Zolman., G. D. Bossart. 2006. Hematology, serum chemistry, and cytology findings from apparently healthy Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) inhabiting the estuarine waters of Charleston, South Carolina. *Aquat. Mamm.* 32(2): 182-195.
- Fiers, W., R. Beyaert., W. Declercq., P. Vandenabeele. 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 18: 7719-7730.
- Finney, D. J. 1952. Probit analysis. *J. Inst. Actuaries.* 78(3): 388-390.

- Finney, D. J., W. L. Stevens. 1948. A Table for the Calculations of Working Probits and Weights in Probit Analysis. *Biometrika*. 35: 191-201.
- Fire, S. E., L. J. Flewelling., M. Stolen., W. N. Durden., M. de Wit., A. C. Spellman., Z. Wang. 2015. Brevetoxin-associated mass mortality event of bottlenose dolphins and manatees along the east coast of Florida, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 526: 241-251.
- Flohé, L., W. A. Günzler. 1984. Assays for glutathione peroxidase. En: Packer, L. (ed.). *Methods in enzymology*. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Inc. Estados Unidos de América. pp. 114-120.
- Francischetti, I., J. B. Moreno., M. Scholz., W. B. Yoshida. 2010. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* 25(4): 575-584.
- Freeman, B. A., Crapo, J. D. 1981. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 256(21): 10,986- 10,992.
- Fridovich, I., B. Freeman. 1986. Antioxidant defenses in the lung. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 693-702.
- Garrel, C., P.A. Fowler., K. H. Al-Gubory. 2010. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J. Endocrinol.* 205: 107-116.
- Garson, G. D. 2012. Testing statistical assumptions. Editorial Garson. Edición 2012. Asheboro, Estados Unidos de América. 54p.
- Geering, B., C. Stoeckle., S. Conus., H. Simon. 2013. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* 34(8): 398-409.
- Geraci, J. R., D. J. St Aubin., I. K. Barker., R. G. Webster., V. S. Hinshaw., W. J. Bean., H. L. Ruhnke., J. H. Prescott., G. Early., A. S. Baker., S. Madoff., R. T. Schooley. 1982. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science.* 215: 1129-1131.
- Gleich, G. J. 1989. Eosinophils, basophils, and mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 64(6): 1024-1027.
- Goldberg, D. M., R. J. Spooner. 1987. Glutathione Reductase. En: Bermeyer-Ulrich, H. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis, Vol 3: Enzymes, 1: Oxidoreductases transferases.* VCH. Alemania. pp. 258-265.
- Goldstein, T., S. P. Johnson., L. J. Werner., S. Nola., B. A. Hilliard. (1998). Causes of erroneous white blood cell counts and differentials in clinically healthy young Northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *J. Zoo Wildlife Med.* 29(4): 408-412.
- Golstein, P., G. Kroemer. 2006. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32(1): 37-43.
- Granger, D. N., Kviety, P. R. 2015. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol.* 6: 524-551.
- Guha, M., N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13: 85-94.

- Habig, W. H., H. B. Jakoby. 1981. Glutathione S-Transferases (Rat and Human). En: Jakoby, W. B. (Ed.). *Methods in enzymology*, Vol 77. Academic Press, Inc. Estados Unidos de América. pp. 218-235.
- Hall, A. J., R. S. Wells., J. C. Sweeney., F. I. Townsend., B. C. Balmer., A. A. Hohn., H. L. Rhinehart. 2007. Annual, seasonal and individual variations in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida. *Comp. Biochem.Phys. A*. 148: 266-277.
- Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method. Enzymol.* 186: 1-85.
- Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Editorial Oxford University Press. Tercera Edición. London, Reino Unido. 936p.
- Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. T.* 35(5): 1147-1150.
- Hannah, S., K. Mecklenburgh., I. Rahman., G. J. Bellingan., A. Greening., C. Haslett., E. R. Chilvers. 1995. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett.* 372: 233-237.
- Heithaus, M. R. 2001. Shark Attacks on Bottlenose Dolpins (*Tursiops aduncus*) in Shark Bay, Western Australia; Attack Rate, Bite Scar Frequencies, and Attack Seasonality. *Mar. Mamm. Sci.* 17(3): 526-539.
- Helsel, D. R. 1990. Less than obvious: Statistical treatment of data below the detection limit. *Environ. Sci. Technol.* 24(12): 1766-1774.
- Hermes-Lima, M., T. Zenteno-Savín. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Phys. C*. 133: 537-556.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos., C. A. Janeway Jr., R. A. B. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284: 1313-1318.
- Houssaye, A., P. Tafforeau., C. de Muizon., P. D. Gingerich. 2015. Transition of Eocene whales from land to sea: evidence from bone microstructure. *Plos ONE*. 10(2): 1-28.
- Hritcu, L., A. Ciobica., M. Stefan., M. Mihasan., L. Palamiuc., T. Nabeshima. 2011. Spatial memory deficits and oxidative stress damage following exposure to lipopolysaccharide in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurosci. Res.* 71: 35-43.
- Ishii, T., K. Itoh., S. Takahashi., H. Sato., T. Yanagawa., Y. Katoh., S. Bannai., M. Yamamoto. 2000. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* 275(21): 16,023-16,029.
- Itou, T., H. Sugisawa., Y. Inoue., T. Jinbo., T. Sakai. 2001. Oxygen radical generation and expression of NADPH oxidase genes in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 47-53.
- Iwasaki, A., R. Medzhitov. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate Immune system. *Science*. 327: 291-295.

- Johnson, S. P., S. Nolan., F. M. D. Gulland. 1998. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from pinnipeds stranded in central and northern California. *J. Zoo and Wild. Med.* 29(3): 288-294.
- Kanerva, M., H. Routti., Y. Tamuz., M. Nyman., M. Nikinmaa. 2012. Antioxidative defense and oxidative stress in ringed seals (*Pusa hispida*) from differently polluted areas. *Aquat. Toxicol.* 114-115: 67-72.
- Kelly, S. A., C. M. Havrillal., T. C. Brady., K. Harris Abramo., E. D. Levin. 1998. Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. *Environ. Health Persp.* 106(7): 375-384.
- Keogh, M. J., J. M. Maniscalco., S. Atkinson. 2010. Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) pups undergo a decrease in circulating white blood cells and the ability of T cells to proliferate during early postnatal development. *Vet. Immunol. Immunop.* 137: 298-304.
- Keogh, M. J., T. Spoon., S. H. Ridgway., E. Jensen., W. Van Bonn., T. A. Romano. 2011. Simultaneous measurement of phagocytosis and respiratory burst of leukocytes in whole blood from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) utilizing flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunop.* 144: 468-475.
- Ketterer, B., B. Coles., D. J. Meyer. 1983. The role of glutathione in detoxification. *Environ. Health Persp.* 49: 59-69.
- Kevin, L. G., E. Novalija., D. F. Stowe. 2005. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth. Analg.* 101: 1275-1287.
- Kew, S., T. Banerjee., A. M. Minihane., Y. E. Finnegan., C. M. Williams., P. C. Calder. 2003. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25-72 y. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1278-1286.
- Kooyman, G. L., Ponganis, P. J. 1998. The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Ann. Rev. Physiol.* 60: 19-32.
- Kurhaluk, N., A. Szarmach., O. V. Zaitseva., A. Sliuta., S. Kyriienko., P. J. Winklewski. 2018. Effects of melatonin on low-dose lipopolysaccharide-induced oxidative stress in mouse, liver, muscle, and kidney. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 96: 1153-1160.
- Lee, A., M. K. B., Whyte., C. Haslett. 1993. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukocyte Biol.* 54: 282-288.
- Lehmann, V., M. A. Freudenberg. C. Galanos. 1987. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J. Exp. Med.* 165: 657-663.
- Lesser, M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 253-278.
- Levin, M., B. Morsey., S. de Guise. 2007. Non-coplanar PCBs Induce Calcium Mobilization in Bottlenose Dolphin and Beluga Whale, but not in Mouse Leukocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 70: 1220-1231.

- Levine, R. L., D. Garland., C. N. Oliver., A. Amici., I. Climent., A. Lenz., B. Ahn., S. Shaltiel., E. R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method. Enzymol.* 186: 464-478.
- Lockwood, S. K., J. L. Chovan., J. K. Gaydos. 2006. Aerobic bacterial isolations from Harbor seals (*Phoca vitulina*) stranded in Washington: 1992-2003. *J. Zoo and Wild. Med.* 37(3): 281-291.
- Lovejoy, C. O., G. Suwa., L. Spurlock., B. Asfaw., T. D. White. 2009. The pelvis and femur of *Ardipithecus ramidus*: the emergence of upright walking. *Science.* 326: 71-71.
- MacKinney Jr, A. A. 1978. Effect of aging on the peripheral blood lymphocyte count. *J. Gerontol.* 33(2): 213-216.
- Mariscalco, M. 1993. Leukocytes and the inflammatory response. *Critica. Care Med.* 21(9): 347-348.
- Markert, M., P. C. Andrews., B. M. Babior. 1984. Measurement of  $O_2^-$  production by human neutrophils. En: Packer, L. (ed.) *Methods in enzymology, oxygen radicals in biological systems.* Editorial Packer. 105. Orlando, Estados Unidos de América. pp. 358-365.
- Marikovsky, M., V. Ziv., N. Nevo., C. Harris-Cerruti., O. Mahler. 2003. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *J. Immunol.* 170(6): 2993-3001.
- Mate, B. R., K. A. Rossbach., S. L. Nieu Kirk. 1995. Satellite-monitored movements and dive behavior of a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Tampa Bay, Florida. *Mar. Mammal Sci.* 11(4): 452-463.
- McCord, J. M. 1985. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.* 312(3): 159-163.
- McFarlane, D., D. C. Sellon., S. A. Gibbs. 2001. Age-related quantitative alterations in lymphocyte subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses. *AJVR.* 62(9): 1413-1417.
- McFee, W. E., T. P. Lipscomb. 2009. Major pathologic findings and probable causes of mortality in bottlenose dolphins stranded in South Carolina from 1993 to 2006. *J. Wildl. Dis.* 45(3): 575-593.
- Medway, W., J. R. Geraci. 1964. Hematology of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Am. J. Physiol.* 207: 1367-1370.
- Melo, E. S., H. V. Barbeiro., S. Ariga., T. Goloubkova., R. Curi., I. T. Velasco., D. Vasconcelos., F. G. Soriano. 2010. Immune cells and oxidative stress in the endotoxin tolerance mouse model. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43(1): 57-67.
- Memon, R. A., I. Staprans., M. Noor., W. M. Holleran., Y. Uchida. 2000. Infection and inflammation induce LDL oxidation *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1536-1542.
- Meir, J. U., C. D. Champagne., D. P. Costa., C. L. Williams., P. J. Ponganis. 2009. Extreme hypoxemic tolerance and blood oxygen depletion in diving elephant seals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297: 927-939.
- Miller, S. I., R. K. Ernst., M. W. Bader. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 36-46.



- Misra, M. K., M. Sarwat., P. Bhakuni., R. Tuteja., N. Tuteja. 2009. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med. Sci. Monit.* 15(10): 209-219.
- Mitchell, R. A., H. Liao., J. Chesney., G. Fingerle-Rowson., J. Baugh., J. David., R. Bucala. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the innate immune response. *PNAS.* 99(1): 345-350.
- Miyashita, A., S. Iyoda., K. Ishii., H. Hamamoto., K. Sekimizu., C. Kaito. 2012. Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiol. Lett.* 333: 59-68.
- Mousa, H. M., O. H. Omer., B. H. Ali., A. Al-Wabel., S. M. Ahmed. 2006. Antioxidant levels in tissues of young and adults camels (*Camelus dromedarius*). *J. Physiol. Biochem.* 62(3): 213-218.
- Nishi, K., T. Oda., S. Takabuchi., S. Oda., K. Fukuda., T. Adachi., G. L. SemenzaL., K. Shingu., K. Hirota. 2008. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent Manner. *Antioxid. Redox Sign.* 10(5): 983-995.
- Noren, S. R., V. Cuccurullo., T. M. Williams. 2004. The development of diving bradycardia in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Comp. Physiol. B.* 174: 139-147.
- Nouri-Shirazi, M., B. F. Bible., M. Zeng., S. Tamjidi., G. D. Bossart. 2017. Phenotyping and comparing the immune cell populations of free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and dolphins under human care. *BMC Vet. Res.* 13: 78-91.
- Ohishi, K., R. Shishido., Y. Iwata., M. Saitoh., R. Takenaka., D. Ohtsu., K. Okutsu., T. Maruyama. 2011. Lipopolysaccharide-induced innate immune factors in the bottlenose dolphin (*T. truncatus*) detected in expression sequence tag analysis. *Microbiol. Immunol.* 55: 790-797.
- Pansarasa, O., L. Castagna., B. Colombi., J. Vecchiet., G. Felzani., F. Marzatico. 2000. Age and Sex Differences in Human Skeletal Muscle: Role of Reactive Oxygen Species. *Free Rad. Res.* 33: 287-293.
- Peddemors, V. M. 1990. Respiratory development in a captive-born bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* calf. *S. Afr. Tydskr. Dierk.* 25(3): 178-184.
- Persky, A. M., P. S. Green., L. Stuble., C. O. Howell., L. Zaulyanov., G. A. Brazaeau., J. W. Simpkins. 2000. Protective effects of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 59-66.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4(2): 89-96.
- Pillay, J., I, den Braber., N. Vriskoop., L. M. Kwast., R. J. de Boer., J. A. M. Borghans., K. Tesselaar., L. Koenderman. 2010. In vivo labeling with <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 116(4): 625-627.
- Pine, M. D., K. Greer., D. Busbee. 2007. Comparison of reactive oxygen scavenging systems between a cetacean (DKN<sub>1</sub>) and a porcine renal epithelial cell line (LLC-PK<sub>1</sub>). *Comp. Biochem. Phys. A.* 147: 550-555.

- Plötz, S. G., A. Lentschat., H. Behrendt., W. Plötz., L. Hamann., J. Ring., E. T. Rietschel., H. Flad., A. J. Ulmer. 2001. The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent. *Blood*. 97(1): 235-241.
- Poggi, P., R. Mirabella., S. Neri., E. Assirelli., P. Dolzani., E. Mariani., P. C. Calder., A. Chatgililoglu. 2015. Membrane fatty acid heterogeneity of leukocyte classes is altered during *in vitro* cultivation but can be restored with *ad-hoc* lipid supplementation. *Lipids Health Dis*. 14: 165-178.
- Ponganis, P. J. 2011. Diving Mammals. *Comp. Physiol*. 1: 517-535.
- Ponganis, P. J., G. L. Kooyman., S. H. Ridgway. 2003. Comparative diving physiology. En: Brubakk, A. O., T. S. Neuman., D. H. Elliott. (ed.). *Bennett and Elliott's Physiology and Medicine of Diving*. Editorial Brubakk, Neuman, y Elliott. pp. 211-226.
- Prashant, A. V., H. Harishchandra., V. D'souza., B. D'souza. 2007. Age related changes in lipid peroxidation and antioxidants in elderly people. *Indian J. Clinical Biochem*. 22(1): 131-134.
- Reddy, M. M., S. V. K., Mahipal., J. Subhashini., M. C. Reddy., K. R. Roy., G. V. Reddy., P. R. K. Reddy., P. Reddanna. 2006. Bacterial lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the impairment of steroidogenesis and spermatogenesis in rats. *Reprod. Toxicol*. 22: 493-500.
- Regoli, F., M. E. Giuliani. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res*. 93: 106-117.
- Repine, J. E., A. Bast., I. Lankhorst., The Oxidative Stress Study Group. 1997. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Resp. Crit. Care*. 156: 341-357.
- Ridgway, S. H. 1986. Diving by cetaceans. *Diving in Animals and Man*, Royal Nor. Soc. Sci. Lett. 1: 33-62.
- Ridgway, S. H., J. G. Simpson., G. S. Patton., W. G. Gilmartin. 1970. Hematologic findings in certain small cetaceans. *JAVMA*. 157(5): 566-575.
- Righetti, B. P. H., P. C. Simões-Lopes., M. M. Uhart., D. Wilhelm Filho. 2014. Relating diving behavior and antioxidant status: Insights from oxidative stress biomarkers in the blood of two distinct divers, *Mirounga leonine* and *Arctocephalus australis*. *J. Comp. Biochem. Phys. A*. 173: 1-6.
- Robinson, A. J., M. Kropatkin., P. M. Aggeler. 1969. Hageman factor (Factor XII) deficiency in marine mammals. *Science*. 166: 1420-1422.
- Ruiz, C. L., H. H. Nollens., S. Venn-Watson., L. G. Green., R. S. Wells., M. T. Walsh., E. C. Nolan., J. F. McBain., E. R. Jacobson. 2009. Baseline circulating immunoglobulin G levels in managed collection and free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Dev. Comp. Immunol*. 33: 449-455.
- Russo, M. 1980. The role of macrophages in the chemotactic response of the polymorphonuclear leukocytes to bacterial lipopolysaccharides (40871). *P. Soc. Exp. Biol. Med*. 164: 326-330.
- Rustan, A. C., C. A. Drevon. 2005. Fatty acids: structures and properties. In *eLS*. 1: 1-7.

- Saito, C., K. Ohishi., Y. Kakizoe., M. Saito., H. Mishima., Y. Hongo., Y. Nakamura., M. Nakazawa., T. Yoshia., T. Maruyama. 2018. Monoclonal antibodies against leukocytes in the beluga whale, *Delphinapterus leucas*. Rep. Res. Dev. 27: 119-126.
- Schaefer, A. M., G. D. Bossart., M. Mazzoil., P. A. Fair., J. S. Reifi. 2011. Risk factors for colonization of *E. coli* in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River Lagoon, Florida. J. Environ. Public Health. 2011: 1-8.
- Scott, M. D., A. A. Hohn., A. J. Westgate., J. R. Nicolas., B. R. Whitaker., W. B. Campbell. 2001. A note on the release and tracking of a rehabilitated pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*). J. Cetacean Res. Manage. 3(1): 87-94.
- Sergeant, D. E. 1973. Age, growth, and maturity of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from Northeast Florida. J. Fish Res. Board Can. 30(7): 1009-1011.
- Shi, J., Y. Zhao., Y. Wang., W. Gao., J. Ding., P. Li., L. Hu., F. Shao. 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature. 514: 187-204.
- Shirai, K., T. Sakai. 1997. Haematological findings in captive dolphins and whales. Aust. Vet. J. 175(7): 512-514.
- Shiraishi, R., T. Itou., H. Sugisawa., Y. Shoji., T. Endo., T. Sakai. 2002. The respiratory burst activity of bottlenose dolphin neutrophils elicited by several stimulants. J. Vet. Med. Sci. 64(8): 711-714.
- Sies, H., Cadenas, E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 311: 617-631.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp. Physiol. 82: 291-295.
- Siracusa, M. C., B. S. Kim., J. M. Spergel., D. Artis. 2013. Basophils and allergic inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. 132(4): 789-814.
- Smith, P. D., A. F. Suffredini., J. B. Allen., L. M. Wahl., J. E. Parrillo., S. M. Wahl. 1994. Endotoxin administration to humans primes alveolar macrophages for increased production of inflammatory mediators. J. Clin. Immunol. 14(2): 141-148.
- Sokolova, O. V. 2005. Peculiarities of phagocytosis in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during the period of adaptation to the captivity conditions. Dokl. Akad. Nauk+. 403: 263-266.
- Spector, A. A., M. A. Yorek. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. J. Lipid Res. 26: 1015-1035.
- Stacey, K. J., M. J. Sweet., D. A. Hume. 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. J. Immunol. 157: 2116-2122.
- Stringer, C. 2016. The origin and evolution of *Homo sapiens*. Phil. Trans. R. Soc. B. 371: 1-12.
- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: Taniguchi, N., Gutteridge, J. (Ed.). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press. R. U. pp. 91-95.

- Šverko, V., S. Sobočanec., T. Balog., T. Marotti. 2004. Age and gender differences in antioxidant enzyme activity: potential relationship to liver carcinogenesis in male mice. *Biogerontol.* 5: 235-242.
- Sweeney, J. F., P. K. Nguyen., G. M. Omann., D. B. Hinshaw. 1998. Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *J. Surg. Res.* 74: 64-70.
- Tan, H., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., Feng, Y. 2016. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1: 1-16.
- Terasawa, F., M. Kitamura., A. Fujimoto., S. Hayama. 1999. Influence of diet on hematological characteristics in bottlenose dolphins. *Jpn. J. Zoo. Wildl. Med.* 4(2): 117-124.
- Thorson, P. H., B. J. Le Boeuf. 1994. Developmental aspects of diving in northern elephant seal pups. En: Le Boeuf, B. J., R. M. Laws. (ed.). *Elephant Seals: Population Ecology, Behavior and Physiology.* Berkeley, Estados Unidos de América. Berkeley, CA: University of California Press. pp. 271-289.
- Thrall, M. A., G. Weiser., R. Allison., T. W. Campbell. 2006. In: *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* Segunda edición. Hoboken, N.J. Wiley-Blackwell Publishing.
- Turrens, J. F., B. A. Freeman., J. G. Levitt., J. D. Crapo. 1982. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 217(2): 401-410.
- Uhen, M. D. 2007. Evolution of marine mammals: back to the sea after 300 million years. *Anat. Rec.* 290: 514-522.
- Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Immunology.* 11, 19-22.
- Valenciano, A. C., R. L. Cowell., T. E. Rizzi., R. D. Tyler. 2013. White Blood Cells. En: Tyler, R. D., R. L. Cowell., T. E. Rizzi., A. C. Valenciano. (ed.). *Atlas of Canine and Feline Peripheral Blood Smears.* Editorial Tyler, Cowell, Rizzi, y Valenciano. Segunda Edición. Estados Unidos de América. pp. 111-213.
- Valle, A., R. Guevara., F. J. García-Palmer., P. Roca., J. Oliver. 2007. Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293: 1302-1308.
- van Elk, C. E., M. W. G. van dep Bilot., B. E. E. Martina., A. D. M. E. Osterhaus., T. Kuiken. 2007. *Escherichia coli* septicemia associated with lack of maternally acquired immunity in a bottlenose dolphin calf. *Vet. Pathol.* 44: 88-92.
- Veneri, D., M. Franchini., A. Vella., G. Tridente., G. Semenzato., G. Pizzolo., R. Ortolani. 2007. Changes of human B and B-1a peripheral blood lymphocytes with age. *Hematology.* 12(4): 337-341.
- Vázquez-Medina, J. P., T. Zenteno-Savín., R. Elsner., R. M. 2007. Glutathione protection against dive-associated ischemia/reperfusion in ringed seal tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 345: 110-118.

- Vázquez-Medina, J. P., T. Zenteno-Savín., R. Elsner., R. M. 2012. Coping with physiological oxidative stress: a review of antioxidant strategies in seals. *J. Comp. Physiol. B.* 182, 741-750.
- Venn-Watson, S., C. R. Smith., F. Gomez., E. D. Jensen. 2011. Physiology of aging among healthy, older bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): comparisons with aging humans. *J. Comp. Physiol. B.* 181: 667-680.
- Venn-Watson, S., E. D. Jensen., S. H. Ridgway. 2007. Effects of age and sex on clinicopathologic reference ranges in a healthy managed Atlantic bottlenose dolphin population. *Am. Vet. Med. Assoc.* 231(4): 596-601.
- Wartzok, D. 2008. Encyclopedia of Marine Mammals. Editorial. En: Würsig, B., W. Perrin., J. G. M. Thewissen. Segunda edición. Estados Unidos de América. 1316p.
- Wenisch, C., S. Patruta., F. Daxböck., R. Krause., W. Hörl. 2000. Effect of age on human neutrophil function. *J. Leukocyte Biol.* 67: 40-45.
- West, K., W. Walker., R. Baird., W. White., G. Levine., E. Brown., D. Schofield. 2009. Diet of pygmy sperm whales (*Kogia breviceps*) in the Hawaiian Archipelago. *Mar. Mammal Sci.* 18: 1-15.
- Wilhelm Filho, D. W., F. Sell., L. Ribeiro., M. Ghislandi., F. Carrasquedo., C. G. Fraga., J. P. Wallauer., D. E. Simões-Wilson., M. M. Uhart. 2002. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comp. Biochem. Phys. A.* 133: 885-892.
- Williams III, C.R., G. B. Chapman., A. S. Blake. 1991. Ultrastructural study of the blood cells of the beluga whale, *Delphinapterus leucas*. *J. Morph.* 209: 97-110.
- Wilson. D. E., D. M. Reeder. 2005. Mammal species of the world: a Taxonomic and Geographic Reference. Editorial Wilson y Reeder. Tercera Edición. Baltimore, Estados Unidos de América. 2142p.
- Wolff, S.M. 1973. Biological effects of bacterial endotoxins in man. *J. Infect. Dis.* 128: 259-264.
- Woźniak, A., G. Drewa., B. Woźniak., D. O. Schachtschabel. 2004. Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of difference ages, both healthy and melanoma-bearing. *Z. Gerontol. Geriat.* 37: 184-189.
- Yam, J., L. Frank., R. J. Roberts. 1978. Oxygen toxicity: comparison of lung biochemical responses in neonatal and adult rats. *Pediat. Res.* 12: 115-119.
- Yamamoto, C., S. Yoshida., H. Taniguchi., M. H. Qin., H. Miyamoto., Y. Mizuguchi. 1993. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestión by Guine Pig macrophages. *Infect. Immun.* 61(5): 1972-1979.
- Zaias, J., C. Bradley., J. Richardson., H. C. Eskelinen., F. Ikpatt., C. Cray. 2017. Evaluating Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocyte differential counts comparing the CellaVision DM96 and the manual method. *Vet. Clin. Path.* 46(3): 1-5.
- Zar, J. H. 1999. Biostatistical analysis. Editorial Prentice Hall. Cuarta Edición. Upper Saddle River, Estados Unidos de América. 663p.

Zenteno-Savín, T., Clayton-Hernandez, E., Elsner, R. 2002. Diving seals: are they a model for coping with oxidative stress? *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicology & Pharmacology*. 133(4): 527-536.

Zenteno-Savín., J. P. Vázquez-Medina., N. Cantú-Medellín., P. J. Ponganis., R. Elsner. 2012. Ischemia/Reperfusion in Diving Birds and Mammals: How they Avoid Oxidative Damage. En: Abele, D., J. P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín. (ed.). *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Primera Edición. Chichester, Reino Unido. pp. 178-189.

Zhu, Y., P. M. Carvey., Z. Ling. 2007. Altered glutathione homeostasis in animals prenatally exposed to lipopolysaccharide. *Neurochem. Int.* 50: 671-680.

## 11. ANEXOS

**Tabla IA.** Conteo diferencial de leucocitos en muestras de *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) y *Homo sapiens* (n = 12) previo ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) y posterior ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a exposición a lipopolisacáridos (LPS). Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar.

		<i>Homo sapiens</i>					<i>Tursiops truncatus gilli</i>				
LPS ( $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ )	Tiempo (horas)	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	Monocitos	Basófilos	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	Monocitos	Basófilos
<b>0</b>	<b>0</b>	$52.1 \pm 1.4$	$35.4 \pm 1.5$	$10.3 \pm 1.8^*$	$0.1 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.7^*$	$53.3 \pm 3.4$	$30.4 \pm 3.7$	$16.1 \pm 0.6^*$	$0.3 \pm 0.2$	$0.1 \pm 0.08^*$
	<b>24</b>	$10.9 \pm 1.8^{\Delta a}$	$80.6 \pm 3.0^{\Delta a}$	$6.7 \pm 1.6$	$0.1 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.5^*$	$18.5 \pm 6.8^a$	$75.3 \pm 7.5^a$	$6.0 \pm 1.6^a$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0^*$
	<b>48</b>	$0.3 \pm 0.2^{*\Delta ab}$	$92.6 \pm 1.4^{\Delta ab}$	$4.9 \pm 1.5^{\Delta a}$	$0.1 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.7^{*\Delta}$	$11.6 \pm 4.8^{*\Delta ab}$	$84.4 \pm 5.4^{ab}$	$3.9 \pm 1.0^a$	$0.08 \pm 0.08$	$0.0 \pm 0.0^*$
<b>10</b>	<b>24</b>	$34.6 \pm 4.5^{\Delta a}$	$58.0 \pm 5.0^{\Delta a}$	$6.4 \pm 1.5$	$0.3 \pm 0.15^*$	$0.6 \pm 0.3^{*a}$	$22.2 \pm 5.9^a$	$72.7 \pm 6.3^a$	$5.2 \pm 1.3^a$	$5.2 \pm 1.3^a$	$0.0 \pm 0.0^*$
	<b>48</b>	$18.3 \pm 4.4^{\Delta ab}$	$71.7 \pm 4.9^{\Delta ab}$	$8.8 \pm 1.0^{*\Delta}$	$0.1 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.5^{*\Delta}$	$17.3 \pm 4.3^{\Delta ab}$	$79.1 \pm 4.8^{ab}$	$3.6 \pm 0.8^{*a}$	$0.08 \pm 0.08$	$0.0 \pm 0.0^*$

Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre especies en el mismo tiempo de incubación y la misma concentración de lipopolisacáridos,  $\Delta$  en la misma especie y al mismo tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> en tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> en el tiempo diferente que 24 horas con la misma concentración de lipopolisacáridos.

**Tabla II.A.** Producción de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ , nanomoles miligramo<sup>-1</sup> de proteína minuto<sup>-1</sup>) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación.

		$O_2^{\cdot-}$ (nanomoles miligramo <sup>-1</sup> proteína minuto <sup>-1</sup> )	
LPS ( $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ )	Tiempo (horas)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>
<b>0</b>	<b>24</b>	0.156 $\pm$ 0.011 *	0.089 $\pm$ 0.011 * <sup>a</sup>
	<b>48</b>	0.135 $\pm$ 0.008	0.137 $\pm$ 0.02 $\Delta$ <sup>a</sup>
<b>10</b>	<b>24</b>	0.138 $\pm$ 0.013	0.115 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>
	<b>48</b>	0.15 $\pm$ 0.016 *	0.291 $\pm$ 0.039 * $\Delta$ <sup>a</sup>

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies,  $\Delta$  dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.



**Tabla IIIA.** Actividad enzimática (U mg<sup>-1</sup> proteínas) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario expuestos a lipopolisacáridos (LPS; 10 µg LPS mL<sup>-1</sup> por 24 o 48 h).

		(A) SOD (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(B) CAT (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(C) GPx (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(D) GR (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(E) GST (U mg <sup>-1</sup> proteína)	
LPS (µg LPS mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (horas)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>
<b>0</b>	<b>24</b>	6055.2 ± 618.7 <sup>*Δ</sup>	2515.7 ± 566.6 <sup>*Δ</sup>	2.6 ± 1.4 <sup>*</sup>	19.5 ± 9.4 <sup>*</sup>	2.37 ± 0.39	2.92 ± 0.74	2.12 ± 0.53 <sup>*Δ</sup>	12.86 ± 3.62 <sup>*</sup>	0.28 ± 0.04 <sup>*Δ</sup>	0.59 ± 0.10 <sup>*</sup>
	<b>48</b>	2893.0 ± 658.07 <sup>a</sup>	1645.8 ± 333.2	7.4 ± 3.3 <sup>*</sup>	32.6 ± 10.7 <sup>*Δ</sup>	1.84 ± 0.41	2.63 ± 0.57	1.32 ± 0.25 <sup>*</sup>	9.52 ± 3.92 <sup>*Δ</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>*</sup>	0.56 ± 0.09 <sup>*Δ</sup>
<b>10</b>	<b>24</b>	3207.4 ± 701.3 <sup>*Δ</sup>	1393.4 ± 304.1 <sup>*Δ</sup>	3.6 ± 1.3	15.0 ± 8.1 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.29	1.86 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.15 <sup>*Δa</sup>	9.37 ± 4.08 <sup>*a</sup>	0.2 ± 0.03 <sup>*Δa</sup>	0.47 ± 0.08 <sup>*a</sup>
	<b>48</b>	2116.4 ± 419.3 <sup>a</sup>	1644.2 ± 293.4	11.3 ± 5.4 <sup>*</sup>	89.1 ± 18.6 <sup>*Δa</sup>	2.14 ± 0.55 <sup>*</sup>	4.34 ± 1.06 <sup>*a</sup>	1.67 ± 0.27 <sup>*a</sup>	18.6 ± 3.61 <sup>*Δa</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>*a</sup>	1.06 ± 0.18 <sup>*Δa</sup>

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, <sup>Δ</sup> dentro del mismo especie y tiempo de incubación, pero con concentraciones diferentes de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo especie y concentración de lipopolisacáridos, pero con tiempos de incubación diferentes.

**Tabla IVA.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), y (B) carbonilos proteicos (μmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Homo sapiens* (n = 12) y *Tursiops truncatus gilli* (n = 12) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación.

		(A) TBARS (nanomoles miligramo <sup>-1</sup> de proteína)		(B) Carbonilos proteicos (μmol miligramo <sup>-1</sup> de proteína)	
LPS (μg LPS mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (horas)	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Tursiops truncatus gilli</i>
<b>0</b>	<b>24</b>	0.0016 ± 0.000087 * Δ	0.0045 ± 0.00024 * Δ a	3.78 ± 0.50	2.58 ± 1.26
	<b>48</b>	0.032 ± 0.026 *	0.0037 ± 0.00026 * Δ a	3.40 ± 0.44 *	1.74 ± 0.57 *
<b>10</b>	<b>24</b>	0.031 ± 0.013 * Δ a	0.0037 ± 0.00029 * Δ a	3.78 ± 0.59 *	1.11 ± 0.51 *
	<b>48</b>	0.0017 ± 0.000055 * a	0.0048 ± 0.00015 * Δ a	3.94 ± 0.48 *	1.93 ± 0.67 *

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre especies, Δ dentro de la misma especie y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, a dentro de la misma especie y concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

**Tabla VA.** Conteo diferencial de leucocitos en las muestras de *Tursiops truncatus gilli* machos (n = 5) y hembras (n = 7) previo (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>) y posterior (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) a exposición a lipopolisacáridos (LPS). Los resultados se muestran como promedio ± error estándar.

		Machos					Hembras				
LPS (µg LPS mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (horas)	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	Monocitos	Basófilos	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	Monocitos	Basófilos
0	0	53.6 ± 7.2	31.0 ± 7.5	14.8 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.2	53.1 ± 3.4	30.0 ± 3.8	17 ± 0.9	0.14 ± 0.14	0.0 ± 0.0
	24	19.6 ± 10.0 <sup>a</sup>	76.4 ± 12.4 <sup>a</sup>	4.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	17.7 ± 9.8 <sup>a</sup>	74.4 ± 10.1 <sup>a</sup>	7.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	48	12.8 ± 7.4 <sup>a</sup>	85.0 ± 8.4 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	10.7 ± 6.8 <sup>ab</sup>	84.0 ± 7.6 <sup>ab</sup>	5.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10	24	20.4 ± 7.2 <sup>a</sup>	76.2 ± 8.6 <sup>a</sup>	3.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	23.4 ± 9.1 <sup>a</sup>	70.1 ± 9.3 <sup>a</sup>	6.4 ± 1.9 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	48	19.4 ± 7.0 <sup>a</sup>	76.8 ± 8.2 <sup>a</sup>	3.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	15.7 ± 5.8 <sup>ab</sup>	80.7 ± 6.4 <sup>ab</sup>	3.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre sexos en el mismo tiempo de incubación y la misma concentración de lipopolisacáridos, <sup>A</sup> en el mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> en tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> en tiempos diferente que 24 horas con la misma concentración de lipopolisacáridos.

**Tabla VIA.** Conteo diferencial de leucocitos en las muestras de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7) previo ( $0 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) y posterior ( $10 \mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) a exposición a lipopolisacáridos (LPS). Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar.

		Inmaduros					Maduros				
LPS ( $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ )	Tiempo (horas)	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	Monocitos	Basófilos	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	Monocitos	Basófilos
0	0	54.0 $\pm$ 6.7	30.0 $\pm$ 7.4	15.4 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	52.9 $\pm$ 3.8	30.7 $\pm$ 4.0	16.6 $\pm$ 0.9	0.0 $\pm$ 0.0	0.14 $\pm$ 0.14
	24	33.6 $\pm$ 13.5 <sup>a</sup>	60.0 $\pm$ 15.8 <sup>a</sup>	6.4 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	7.7 $\pm$ 3.2 <sup><math>\Delta</math>a</sup>	86.1 $\pm$ 3.1 <sup><math>\Delta</math>a</sup>	5.7 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
	48	23.4 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>	72.2 $\pm$ 11.3 <sup>ab</sup>	4.2 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	0.2 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 1.5 <sup><math>\Delta</math>ab</sup>	93.1 $\pm$ 1.2 <sup><math>\Delta</math>ab</sup>	3.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
10	24	31.0 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>	65.8 $\pm$ 14.4 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	15.9 $\pm$ 3.3 <sup><math>\Delta</math>a</sup>	77.6 $\pm$ 4.1 <sup><math>\Delta</math>a</sup>	6.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
	48	22.4 $\pm$ 9.2	74.2 $\pm$ 10.6	3.4 $\pm$ 1.7	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	13.6 $\pm$ 3.5 <sup><math>\Delta</math>a</sup>	82.6 $\pm$ 3.9 <sup><math>\Delta</math>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.14	0.0 $\pm$ 0.0

Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre estadios de madurez en el mismo tiempo de incubación y la misma concentración de lipopolisacáridos,  <sup>$\Delta$</sup>  en el mismo estadio de madurez y al mismo tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> en tiempos de incubación diferentes que 0 horas, <sup>b</sup> en el tiempo diferente que 24 horas con la misma concentración de lipopolisacáridos.

**Tabla VIIA.** Producción de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ , nanomoles miligramo<sup>-1</sup> de proteína minuto<sup>-1</sup>) de (A) machos (n = 5) y hembras (n = 7), y (B) inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* en cultivo primario en ausencia (0  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) o presencia (10  $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ ) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación.

		(A) $O_2^{\cdot-}$ (nanomoles miligramo <sup>-1</sup> proteína minuto <sup>-1</sup> ) entre sexos		(B) $O_2^{\cdot-}$ (nanomoles miligramo <sup>-1</sup> proteína minuto <sup>-1</sup> ) entre estadios de madurez	
LPS ( $\mu\text{g LPS mL}^{-1}$ )	Tiempo (horas)	Machos	Hembras	Inmaduros	Maduros
0	24	0.096 ± 0.021	0.084 ± 0.014	0.069 ± 0.019	0.104 ± 0.012 <sup>a</sup>
	48	0.161 ± 0.031	0.12 ± 0.014 <sup>Δ</sup>	0.136 ± 0.017	0.138 ± 0.025 <sup>Δa</sup>
10	24	0.123 ± 0.043	0.109 ± 0.034	0.074 ± 0.027	0.144 ± 0.037
	48	0.407 ± 0.054 <sup>*</sup>	0.207 ± 0.026 <sup>*Δ</sup>	0.260 ± 0.077	0.313 ± 0.043 <sup>Δ</sup>

Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) \* entre sexos / estadios de madurez, <sup>Δ</sup> dentro del mismo sexo / estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo / estadio de madurez y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.

**Tabla VIII.A.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n= 5) y hembras (n = 7) en cultivo primario en ausencia (0 µg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 µg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación.

		(A) SOD (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(B) CAT (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(C) GPx (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(D) GR (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(E) GST (U mg <sup>-1</sup> proteína)	
LPS (µg LPS mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (horas)	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
0	24	1627.3 ± 200.5	3150.4 ± 910.4 <sup>Δ</sup>	22.3 ± 22.3	17.6 ± 6.3	3.1 ± 1.0	2.8 ± 1.1	14.5 ± 8.3	11.7 ± 2.8 <sup>Δ</sup>	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1
	48	1500.6 ± 229.6	1749.6 ± 565.2	52.8 ± 21.4	18.2 ± 7.8	3.1 ± 1.1	2.3 ± 0.7	5.4 ± 1.4 <sup>Δ</sup>	12.5 ± 6.6	0.5 ± 0.1 <sup>Δ</sup>	0.6 ± 0.1
10	24	1480.8 ± 492.7	1330.9 ± 416.5 <sup>Δ</sup>	17.8 ± 9.3 <sup>a</sup>	13.1 ± 12.7	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.4	14.6 ± 9.9	5.6 ± 0.7 <sup>Δa</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
	48	2241.7 ± 477.9	1217.4 ± 298.2	127.1 ± 19.8 <sup>a</sup>	61.9 ± 24.7	5.6 ± 1.6	3.4 ± 1.4	20.1 ± 6.5 <sup>Δ</sup>	17.5 ± 4.5 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.4 <sup>*Δa</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>*a</sup>

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre sexos, <sup>Δ</sup> dentro del mismo sexo y tiempo de incubación, pero con concentraciones diferentes de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y concentración de lipopolisacáridos, pero con tiempos de incubación diferentes.

**Tabla IXA.** Actividad enzimática (unidades miligramo<sup>-1</sup> proteína) de (A) superóxido dismutasa (SOD), (B) catalasa (CAT), (C) glutatión peroxidasa (GPx), (D) glutatión reductasa (GR), y (E) glutatión S-transferasa (GST) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7) en cultivo primario expuestos a lipopolisacáridos (LPS; 10 µg LPS mL<sup>-1</sup> por 24 o 48 h) separados por estadio de madurez.

		(A) SOD (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(B) CAT (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(C) GPx (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(D) GR (U mg <sup>-1</sup> proteína)		(E) GST (U mg <sup>-1</sup> proteína)	
LPS (µg LPS mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (horas)	Inmaduros	Maduros	Inmaduros	Maduros	Inmaduros	Maduros	Inmaduros	Maduros	Inmaduros	Maduros
0	24	2485.1 ± 514.5 <sup>Δ</sup>	2537.6 ± 939.6	5.4 ± 4.4	29.6 ± 15.1	4.4 ± 1.5	1.9 ± 0.4	20.1 ± 7.2 <sup>Δ</sup>	7.7 ± 2.4	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1
	48	2621.4 ± 499.4 <sup>*</sup>	949.0 ± 189.4 <sup>*Δ</sup>	16.9 ± 9.4	43.8 ± 16.4 <sup>Δ</sup>	2.8 ± 0.8	2.5 ± 0.8	15.7 ± 9.1	5.1 ± 0.9 <sup>Δ</sup>	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1 <sup>Δ</sup>
10	24	1588.9 ± 516.7 <sup>Δ</sup>	1253.8 ± 394.5	33.9 ± 16.5	1.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.4	6.7 ± 0.4 <sup>Δa</sup>	11.3 ± 7.1	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1
	48	1617.3 ± 213.9	1663.4 ± 498.6 <sup>Δ</sup>	74.5 ± 38.9	99.4 ± 18.0 <sup>Δa</sup>	5.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	3.5 ± 1.1	19.6 ± 5.5 <sup>a</sup>	17.9 ± 5.1 <sup>Δ</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>Δ</sup>

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre estadios de madurez, <sup>Δ</sup> dentro del mismo estadio madurez y tiempo de incubación, pero con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y concentración de lipopolisacáridos, pero con tiempos de incubación diferentes.

**Tabla XA.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) carbonilos proteicos (μmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* machos (n = 5) y hembras (n = 7) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación.

		(A) TBARS (nanomoles miligramo <sup>-1</sup> de proteína)		(B) Carbonilos proteicos (μmol miligramo <sup>-1</sup> de proteína)	
LPS (μg LPS mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (horas)	Machos	Hembras	Machos	Hembras
0	24	0.0038 ± 0.00027 *	0.0050 ± 0.00023 * <sup>Δ a</sup>	1.07 ± 0.43	3.66 ± 2.11
	48	0.0034 ± 0.00038 <sup>Δ</sup>	0.0040 ± 0.00033 <sup>Δ a</sup>	2.78 ± 1.12	0.99 ± 0.43
10	24	0.0032 ± 0.00049	0.0040 ± 0.00032 <sup>Δ a</sup>	1.71 ± 1.17	0.68 ± 0.30
	48	0.0045 ± 0.00013 <sup>Δ</sup>	0.0050 ± 0.00021 <sup>Δ a</sup>	1.78 ± 0.71	2.03 ± 1.08

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre sexos, <sup>Δ</sup> dentro del mismo sexo y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo sexo y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.



**Tabla XIA.** Concentración de (A) sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS, nmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína), (B) carbonilos proteicos (μmol miligramo<sup>-1</sup> de proteína) en los leucocitos de *Tursiops truncatus gilli* inmaduros (n = 5) y maduros (n = 7) en cultivo primario en ausencia (0 μg LPS mL<sup>-1</sup>) o presencia (10 μg LPS mL<sup>-1</sup>) de lipopolisacáridos (LPS) a 24 y 48 horas de incubación.

		(A) TBARS (nanomoles miligramo <sup>-1</sup> de proteína)		(B) Carbonilos proteicos (μmol miligramo <sup>-1</sup> de proteína)	
LPS (μg LPS mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (horas)	Inmaduros	Maduros	Inmaduros	Maduros
0	24	0.0048 ± 0.00022	0.0042 ± 0.00038 <sup>Δ a</sup>	2.05 ± 1.16	2.96 ± 2.08
	48	0.0043 ± 0.00044 *	0.0033 ± 0.00021 * <sup>Δ a</sup>	2.15 ± 0.86	1.44 ± 0.78
10	24	0.0042 ± 0.00058	0.0033 ± 0.00021 <sup>Δ a</sup>	0.58 ± 0.16	1.49 ± 0.87
	48	0.0048 ± 0.00015	0.0048 ± 0.00025 <sup>Δ a</sup>	2.40 ± 1.49	1.59 ± 0.55

Diferencias significativas (p < 0.05) \* entre estadios de madurez, <sup>Δ</sup> dentro del mismo estadio de madurez y tiempo de incubación con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos, <sup>a</sup> dentro del mismo estadio de madurez y la misma concentración de lipopolisacáridos en diferentes tiempos de incubación.