

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

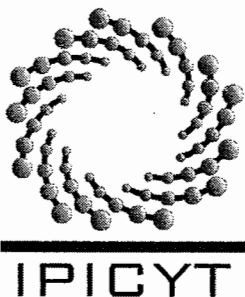
**“Efecto de los ftalatos DBP y BBP sobre la  
expansión *in vitro* de las células  
hematopoyéticas humanas”**

Tesis que presenta  
**Tomás Ortiz Rodríguez**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**  
**Dr. Antonio De León Rodríguez**

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre de 2016



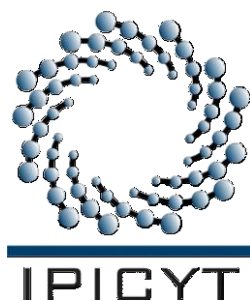
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Efecto de los ftalatos DBP y BBP sobre la expansión in vitro de las células hematopoyéticas humanas***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Tomás Ortiz Rodríguez** y aprobada el **cuatro de noviembre del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Antonio de León Rodríguez**  
Director de la tesis

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
Miembro del Comité Tutorial

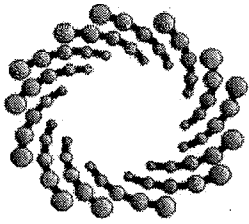
**Dr. Samuel Lara González**  
Miembro del Comité Tutorial



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 298411 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Se agradece al financiamiento de fondo sectorial Salud-CONACyT No. **233340**



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 159 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de noviembre del año 2016, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Samuel Lara González</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Tomás Ortiz Rodríguez**

sobre la Tesis intitulada:

***Efecto de los ftalatos DBP y BBP sobre la expansión in vitro de las células hematopoyéticas humanas***

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Antonio De León Rodríguez**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 18:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de noviembre de 2016.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



## Dedicatorias

*DEDICO ESTE TRABAJO A MI FAMILIA, EN ESPECIAL A MI MADRE QUE HA SIDO EL CATALIZADOR DE MI INSPIRACIÓN Y SUPERACIÓN.*

## Agradecimientos

*Al Dr. Antonio De León Rodríguez por aceptar ser mi Director de Tesis, por haberme brindado un espacio en su laboratorio, por su asesoría, disponibilidad y paciencia.*

*A los doctores Ana Paulina Barba de la Rosa y Samuel Lara González por formar parte del comité tutorial, por las sugerencias y comentarios para la mejora del presente trabajo.*

*Al M. en B. Leandro Gabriel Ordóñez por el apoyo técnico y administrativo.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada No. 298411 y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.*

*A mis amigos y compañeros de la generación 2013-2015 (Cindy, Paola, Mónica, Erick, Ana, Oscar, Edgar, Rogelio y Aarón)*

*A mis amigos del laboratorio 4 (Lab 4), de los cuales aprendí mucho en este tiempo de convivir con ellos, tanto en lo profesional como en lo personal, especialmente a Gil, Rodrigo (El Rigo), Musu (El Sergio) Karen, Zazil y Ángel (Gracias totales, pues con sus consejos y comentarios, me ayudaron bastante a salir adelante en la culminación de este trabajo).*

*También, a todas aquellas personas que conocí durante mi estancia en el IPICYT y que me apoyaron cuando más lo necesitaba; espero permanezca la amistad, que el tiempo y la distancia no las disuelva.*

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	ii
<b>Créditos Institucionales</b>	iii
<b>Agradecimientos</b>	vi
<b>Contenido</b>	vii
<b>Lista de figuras</b>	viii
<b>Resumen</b>	ix
<b>Abstract</b>	x
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	13
2.1 Obtención, cultivo y conteo de células hematopoyéticas aisladas de sangre de cordón umbilical.	13
2.2 Determinación de progenitores hematopoyéticos por medio del ensayo clonogénicos.	14
2.3 Análisis estadístico	15
<b>3. RESULTADOS</b>	16
3.1 Efecto de los ftalatos en células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	16
3.2 Efecto de los ftalatos sobre la expansión de las células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	22
4.1 Efecto de los ftalatos en células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	27
4.2 Efecto de los ftalatos en células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical	29
<b>5. CONCLUSIONES</b>	33
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	34
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	35

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema general de la hematopoyesis humana.	2
Figura 2. Modo de acción de los disruptores endocrinos sobre los receptores endocrinos.	8
Figura 3. Estructura química de los ftalatos.	10
Figura 4. Diferentes vías de exposición a DE.	12
Figura 5. Cultivos de CMN expuestos a ftalatos.	19
Figura 6. Expansión celular máxima de las CMN de SCU expuestas a DBP.	20
Figura 7. Expansión celular máxima de las células hematopoyéticas de SCU expuestas a BBP.	21
Figura 8. Expansión de progenitores hematopoyéticos totales expuestos a DBP.	23
Figura 9. Expansión de progenitores hematopoyéticos totales expuestos a BBP.	24
Figura 10. Progenitores hematopoyéticos obtenidos mediante el ensayo clonogénico.	26



# Resumen

## Efecto de los ftalatos DBP y BBP sobre la expansión *in vitro* de las células hematopoyéticas humanas

Los ftalatos son aditivos que le confieren a los plásticos mejores propiedades como mayor flexibilidad y durabilidad, sin embargo no están unidos covalentemente a la matriz del polímero, lo que permite que fácilmente puedan migrar y pasar al ser humano a través de la dieta. En diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se han confirmado los efectos adversos en la salud provocados por estos compuestos, desde citotoxicidad hasta disrupción endocrina. El ser humano se encuentra continuamente expuesto a los ftalatos; ya que una gran cantidad de productos alimenticios son empacados en recipientes plásticos. Estas sustancias han sido detectadas en diferentes fluidos corporales humanos; incluyendo la sangre de cordón umbilical, la cual contiene células seminales hematopoyéticas que son usadas como tratamiento para una gran cantidad de enfermedades genéticas y malignas del sistema hematopoyético principalmente en recién nacidos. Esto es preocupante, ya que el éxito de la terapia depende tanto de la cantidad, como de la calidad de las células trasplantadas. Hasta este momento no se ha estudiado el efecto del dibutil ftalato (DBP) y bencil-butil ftalato (BBP) sobre las células seminales hematopoyéticas expuestas a dichos contaminantes. Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los ftalatos: dibutil ftalato (DBP) y bencil-butil ftalato (BBP) sobre la expansión *in vitro* de células hematopoyéticas humanas. Los resultados demostraron que ha concentraciones de 0.01 hasta 100 µg/mL de DBP y BBP mostraron un efecto citotóxico, ya que se redujo la expansión celular total desde un 28% hasta un 81% y de un 23% hasta un 68%, respectivamente. Además se demostró en el Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), que los progenitores hematopoyéticos expuestos a concentraciones de 10 y 100 µg/mL de DBP, mostraron una reducción significativa de 74.6 % y 99.1% respectivamente comparadas con el control, mientras que en el caso del BBP solo se observó una reducción significativa de 97.1% con respecto al control a una concentración de 100 µg/mL. Con esto se concluye que los ftalatos DBP y BBP son tóxicos para las células hematopoyéticas principalmente sobre los progenitores hematopoyéticos; ya que afectan su expansión *in vitro*. Esta información es útil dado que células expuestas a concentraciones tóxicas de ftalatos podrían no ser útiles para usarse en terapia clínica, por presentar un posible daño y dar como resultado en un trasplante no exitoso.

**PALABRAS CLAVE.** Plásticos, plastificantes, DBP, BBP, disruptor endocrino, toxicidad, progenitores hematopoyéticos, hematopoyesis.

## Abstract

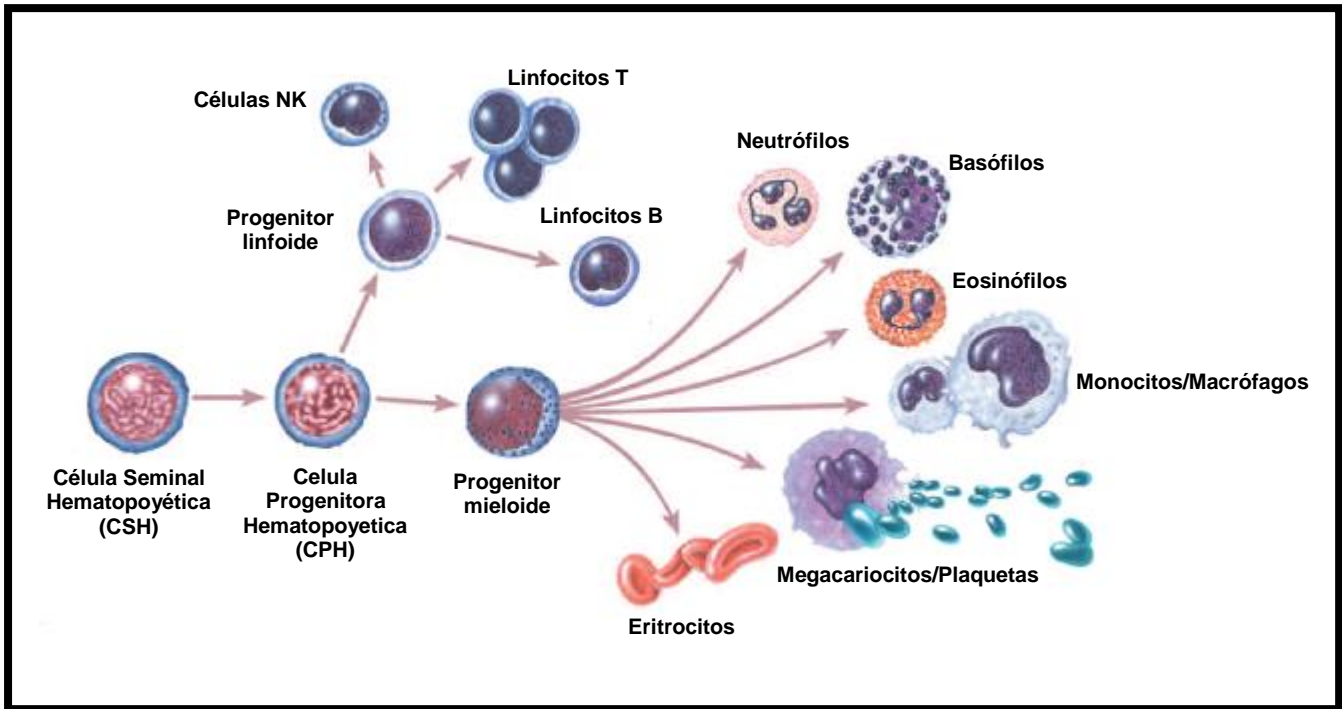
### Effect of DBP and BBP phthalates on *in vitro* expansion of human hematopoietic cell

Phthalates are additives used to improve plastic properties such as flexibility and durability, however they are not covalently bound to the polymer matrix, which allowing them to easily migration and pass to humans consumption through the diet. In several studies both *in vitro* and *in vivo* they have been confirmed to have adverse effects caused by these compounds, from cytotoxicity to endocrine disruption. The human population is continuously exposed to phthalates; because a lot of food products are packaged in plastic containers. These substances have been detected in different human body fluids including cord blood, which contains hematopoietic stem cells that are used as treatment for many genetic and malignant diseases of the hematopoietic system primarily in infants. This is of concern of the success of therapy depends on both the quantity and quality of the transplanted cells. Until now it has not studied the effect of dibutyl phthalate (DBP) and benzyl-butyl phthalate (BBP) on hematopoietic stem cells exposed to these contaminants. For this reason the aim of this study was to evaluate the effect of two phthalates: dibutyl phthalate (DBP) and benzyl butyl phthalate (BBP) on the *in vitro* expansion of human hematopoietic cells. The results indicate that the concentrations ranging from 0.01 to 100 µg / mL evaluated of DBP and BBP showed cytotoxic, a reduction was observed in the total cell expansion from 28% to 81% and from 23% to 68%, respectively. Moreover, in the Colony Forming Unit (CFU) assay, which hematopoietic progenitor exposed to 10 and 100 µg/mL of DBP showed a significant reduction of 74.6% and 99.1% respectively compared to the control. While in the case of BBP only affected significantly at a concentration of 100 µg/mL. With, these results, we conclude that DBP and BBP might cytotoxic effect on the hematopoietic cells because they affect the *in vitro* cell expansion. This information is useful because cells exposed to toxic concentrations of phthalates may not be optimal for clinical therapy use, to present a possible damage and result in an unsuccessful transplantation.

**KEYWORDS.** Plastics, plasticizers, DBP, BBP, endocrine disruptor, toxicity, hematopoietic progenitors, hematopoiesis.

## 1. INTRODUCCION

La hematopoyesis es el proceso de formación de los componentes celulares de la sangre (eritrocitos, linfocitos, granulocitos, megacariocitos/plaquetas, monocitos/macrófagos) entre otras (Kelley & Daley, 2013). Todas las células sanguíneas surgen de la célula seminal o troncal hematopoyética (CSH) que reside en la médula ósea (MO), sitio donde se lleva a cabo la hematopoyesis en la etapa adulta (Rieger & Schroeder, 2012). (**Figura 1**). La sangre es uno de los tejidos con mayor capacidad regenerativa y plástica, dado que se producen  $10^{11}$ - $10^{12}$  millones de células sanguíneas en un día, producto del proceso normal de renovación celular o por cambios en los niveles sanguíneos causados por alguna enfermedad, infección o trauma (Smith, 2003, Rieger & Schroeder, 2012, Andrade-Zaldívar *et al.*, 2014). Las células troncales hematopoyéticas se caracterizan por tener algunas capacidades únicas como la habilidad de auto-renovación y de diferenciación. Las CSH dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), los cuales han perdido su capacidad auto-replicativa, pero mantienen su capacidad proliferativa y de diferenciación, las CPH dan origen a todas las células hematopoyéticas (entre ellos los linajes mieloides y linfoides), los cuales a su vez dan origen a cada uno de los tipos celulares que conforman el sistema hematopoyético (Torok-Storb, 1988, Domen *et al.*, 2006, Granick *et al.*, 2012).



**Figura 1. Esquema general de la hematopoyesis humana.**

Las células sanguíneas se derivan de la célula seminal hematopoyética, la cual da origen a los progenitores multipotentes, la cual a su vez, se puede diferenciar en dos linajes (células progenitoras linfoides y células progenitoras mieloides). Las células progenitoras linfoides se especializan y forman a los linfocitos T, linfocitos B y a las células Natural Killer (NK). Los progenitores mieloides, dan origen a los glóbulos rojos, a los megacariocitos/plaquetas, monocitos/macrófagos y a los granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos). Tomado y modificado de (Domen *et al.*, 2006).

La células seminales hematopoyéticas pueden obtenerse de una variedad de tejidos, como la médula ósea, de la sangre periférica (previa movilización desde la médula ósea por medio de estimulación con Factor Estimulante de Colonia-Granulocítica (G-CSF) o Factor Estimulante de Colonia-Granulocítica-Monocítica (GM-CSF), hígado fetal y del cordón umbilical (Thomas *et al.*, 2002, Granick *et al.*, 2012, Hequet, 2015). Enseguida se describirá un poco más a detalle de cada una de las fuentes:

**Medula ósea (MO):** Es la fuente clásica de CSH utilizadas en trasplantes desde su uso por primera vez en 1957 por E. Donnall Thomas (Appelbaum, 2007). La medula ósea se colecta de la cresta posterior del hueso iliaco, bajo anestesia general del donante. La cantidad necesaria para un trasplante exitoso es de al menos  $2.4 \times 10^8$  células nucleadas por kg de peso del receptor (Appelbaum, 2007, Yesilipek, 2014). La medula ósea presenta los inconvenientes, de que es un procedimiento invasivo (traumático) y no siempre hay donadores compatibles (Andrade-Zaldivar *et al.*, 2011).

**Sangre periférica:** En el año 1971 se detectó la presencia de CSH en la sangre periférica (SP), las cuales deben de ser movilizadas desde la medula ósea hacia el torrente sanguíneo con ayuda de la administración de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Día}$  de G-CSF de 4-5 días antes del proceso de aféresis (proceso de separación de los componentes de la sangre) (Hequet, 2015). Mediante este proceso se han recolectado hasta  $4 \times 10^6$  progenitores/kg de peso corporal y la cantidad mínima reportada para que ocurra un injerto exitoso es de al menos  $2 \times 10^6$  progenitores/kg (Kurnaz & Kaynar, 2015). El procedimiento para obtener CSH de sangre periférica tienen la ventaja con respecto a las de médula ósea, ya que se

evita la hospitalización del donante (Horowitz, 2009). Sin embargo no siempre es posible la movilización de las células, debido a que depende de varios factores como: la edad, la presencia de infecciones o de ciertas enfermedades como la *Diabetes*. También depende de la intensidad de quimioterapia y radioterapia antes de la recolección de las células. Aunado a esto ha surgido un debate con respecto al uso de G-CSF, dado que hay varios reportes que relacionan un incremento en el riesgo de la aparición de leucemias en donadores sanos, posterior a la aplicación de dicho quimiomovilizador (Moalic, 2013, Kurnaz & Kaynar, 2015).

**Sangre de cordón umbilical (SCU):** El uso del cordón umbilical como fuente de CSH, fue propuesto por primera vez por el Dr. Hal E. Broxmeyer en 1982, sin embargo fue hasta 1988 en Francia, cuando la Dra. Eliane Gluckman llevó a cabo el primer trasplante exitoso de este tipo de células en un niño de 5 años que presentaba anemia de Falconi (Broxmeyer & Smith, 2009). La sangre del cordón, es recolectada en condiciones estériles y colocada en un tubo con algún agente anticoagulante. El volumen y el número de CSH y CPH recolectada puede variar dependiendo de la muestra, obteniéndose en el mejor de los casos cantidades que oscila entre  $108 \pm 28$  mL de SCU,  $1.25 \pm 0.53 \times 10^9$  CMN y  $3.6 \pm 3.3 \times 10^6$  CPH (Hequet, 2015). La dosis recomendada para un trasplante exitoso van desde  $2 \times 10^7$  a  $2.5 \times 10^7$  CMN/kg y  $1.7 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  de CPH/kg (Andrade-Zaldivar *et al.*, 2008, Andrade-Zaldívar *et al.*, 2014, Yesilipek, 2014). Varios reportes demuestran que la SCU tiene ventajas con respecto a otras fuentes de CSH y CPH. Por ejemplo una de estas ventajas es que las células se obtiene a través de un procedimiento no invasivo e indoloro y además estas células pueden ser almacenadas por criopreservación para su posterior uso, aunado a esto se ha

observado que debido a la inmadurez de los linfocitos presentes en la SCU, hay un bajo riesgo de enfermedad injerto contra hospedero (por sus siglas en Inglés: GVHD, *Graft Versus Host Disease*), lo que permite un mayor número de compatibilidad entre los donantes y los receptores (Gluckman *et al.*, 1997, Andrade-Zaldívar *et al.*, 2014). No obstante, la cantidad de CSH no siempre es suficiente, lo que reduce su posible uso a individuos de bajo peso corporal, limitándolo a pacientes pediátricos en la mayoría de los casos (Andrade-Zaldívar *et al.*, 2008, Andrade-Zaldívar *et al.*, 2014). Recientemente se han tomados ciertas medidas para eliminar este problema, por ejemplo, el trasplante de dos unidades de sangre de cordón umbilical (USCU) (donde una unidad equivale aproximadamente a 80 mL de SCU) o la infusión simultáneamente tanto de CSH de sangre periférica y CSH de cordón umbilical. Sin embargo uno de los métodos más prometedores es la expansión *in vitro* de las CSH de SCU (Yesilipek, 2014). El cultivo *in vitro* de las CSH requiere de un microambiente adecuado, por esta razón se han probado diferentes medios de cultivo, al cual se le adicionan ciertas citocinas, factores de crecimiento y suplementos. El medio de cultivo que más se ha utilizado es el de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM por sus siglas en inglés), adicionado con suero animal o humano y diferentes combinaciones de citocinas entre las que destacan Factor de Células Seminales (SCF), Ligando del receptor FLT-3 (Flt-3L), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF) Interleucina 3 (IL-3), Interleucina 6 (IL-6) y Eritropoyetina (EPO) (Andrade-Zaldívar *et al.*, 2008, Koestenbauer *et al.*, 2009).

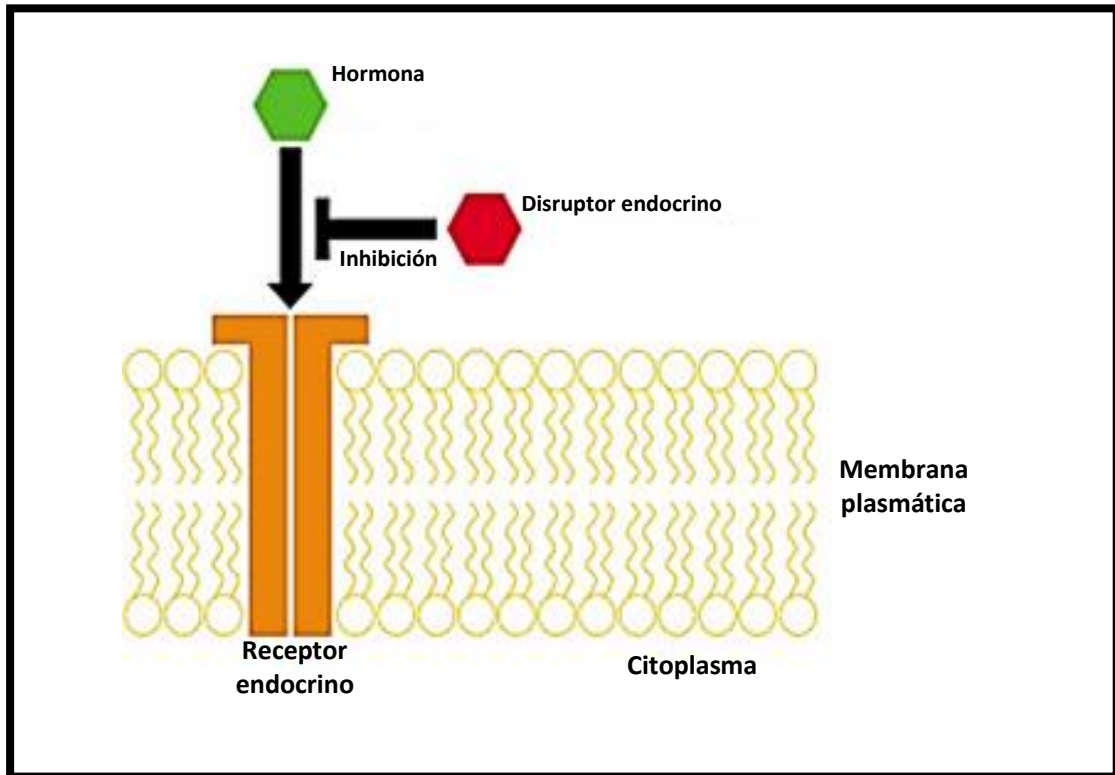
Los trasplantes de células hematopoyéticas, se han utilizado en muchas

enfermedades; para corregir defectos congénitos o adquiridos que afectan la producción de las células sanguíneas (Talasemias o anemia de Falconi) o en la función inmune (Leucemias mieloide o linfoide) y en otros casos para restablecer la hematopoyesis después de altas dosis de terapias citotóxicas (quimioterapia o radioterapia) en contra de tumores sólidos como en el cáncer de mama, de ovario o testículos entre otros (Horowitz, 2009, Andrade-Zaldívar *et al.*, 2014, Kurnaz & Kaynar, 2015). En estos trasplantes comúnmente se usan células recién extraídas de las fuentes antes mencionadas, sin ningún tipo de expansión previa (Koestenbauer *et al.*, 2009). Esto debido a que no se han establecido las estrategias óptimas para la expansión de dichas células (Lim *et al.*, 2013).

Recientemente se ha reportado la presencia de ciertas sustancias tóxicas denominados disruptores endocrinos en la sangre de cordón umbilical (Padmanabhan *et al.*, 2008, Lin *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2014). Esto sugiere que desde etapas tempranas los seres humanos, están expuestos a este tipo de compuestos y con ello, propensos a diversos efectos adversos en la salud; principalmente en el sistema hematopoyético (Ahmed, 2000). Además las células hematopoyéticas extraídas de dicha sangre podrían presentar algún tipo de alteración o daño, por la exposición a estos compuestos, lo que daría como resultado en un trasplante de células hematopoyéticas no exitoso (Manz *et al.*, 2014, Manz *et al.*, 2015). Los disruptores endocrinos (DE) son xenobióticos que interfieren o alteran la función del sistema endocrino provocando efectos adversos en la salud del individuo o de su progenie (Witorsch & Thomas, 2010, Wielogorska *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2015). Esto se debe a que los DE pueden mimetizar o bloquear la acción de las hormonas esteroideas; provocando respectivamente



desórdenes reproductivos o alteraciones en el desarrollo en los individuos expuestos (**Figura 2**) (Kim *et al.*, 2004, Olujimi *et al.*, 2010, Mankidy *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2015). Los DE también pueden provocar un efecto citotóxico (Jones *et al.*, 1975, Benachour & Aris, 2009, Manz *et al.*, 2015).

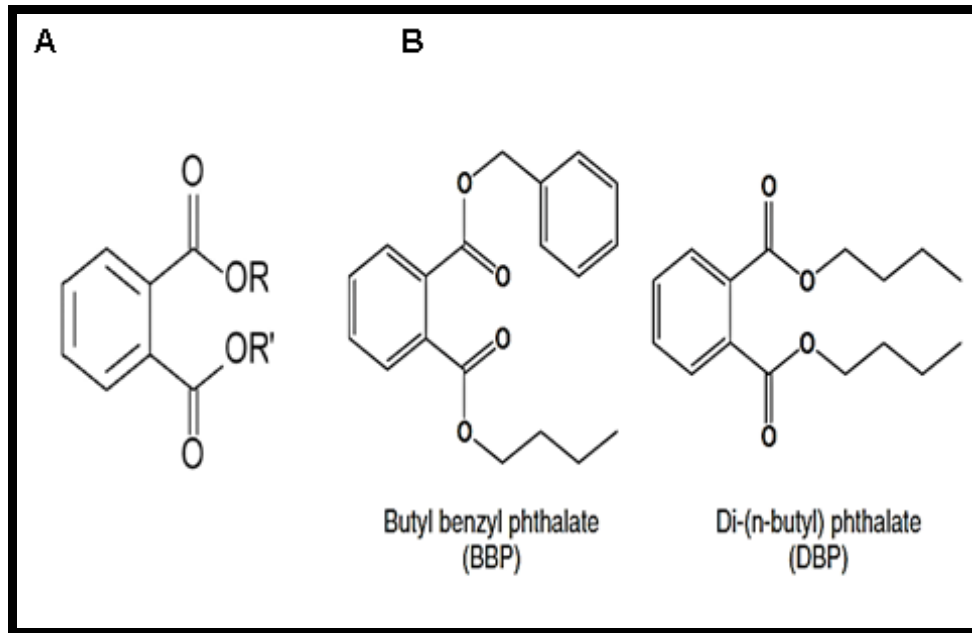


**Figura 2. Modo de acción de los disruptores endocrinos sobre los receptores endocrinos.**

Los disruptores endocrinos (DE) se unen a ciertos receptores endocrinos (RE), mimetizando o bloqueando la acción de las hormonas endógenas. Tomado y modificado de (Kim *et al.*, 2004).

Los DE abarcan una gran diversidad de sustancias incluyendo: productos naturales (fitoestrógenos), contaminantes ambientales (plaguicidas), fármacos (esteroides sintéticos) y químicos industriales (plastificantes) (Zacharewski *et al.*, 1998, Jalova *et al.*, 2013). Dentro de la gran cantidad de sustancias químicas industriales, los plastificantes han despertado un gran interés debido a que su producción a nivel mundial, es de aproximadamente 8 millones de toneladas cada año, lo que ha incrementado su exposición al medio ambiente y al ser humano (Ahmad *et al.*, 2014, Romani *et al.*, 2014). Debido a esto estos compuestos presentan un carácter ubicuo; ya estos compuestos se ha detectado en agua, aire, sedimentos, suelo, alimentos, inclusive en muestras de sangre periférica humana, plasma, leche materna, orina, fluido amniótico, entre otras (Witorsch & Thomas, 2010, Mankidy *et al.*, 2013, Ahmad *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2014). Sin embargo el factor más importante para el estudio de los plastificantes, se debe a que muchos de estos compuestos presentan una ligera o moderada actividad disruptora endocrina (Andersen *et al.*, 1999) o pueden inducir cáncer (Wang *et al.*, 2012). Tal es el caso de grupo de los ftalatos (**Figura 3**), los cuales se usan comúnmente para conferir flexibilidad y durabilidad a diferentes productos entre los que destacan: juguetes, pinturas, adhesivos, lubricantes, material de empaque, recipientes plásticos, productos de cuidado personal, dispositivos médicos y material de laboratorio (Jones *et al.*, 1975, Witorsch & Thomas, 2010, Yang *et al.*, 2015). No obstante, estos compuestos no se unen covalentemente a la matriz del polímero y pueden migrar fácilmente al medio ambiente o a todo lo que tenga contacto con estos. Una vez liberados éstos tienen el potencial de transportarse a largas distancias y eventualmente entrar en la cadena alimenticia (Mankidy *et al.*,

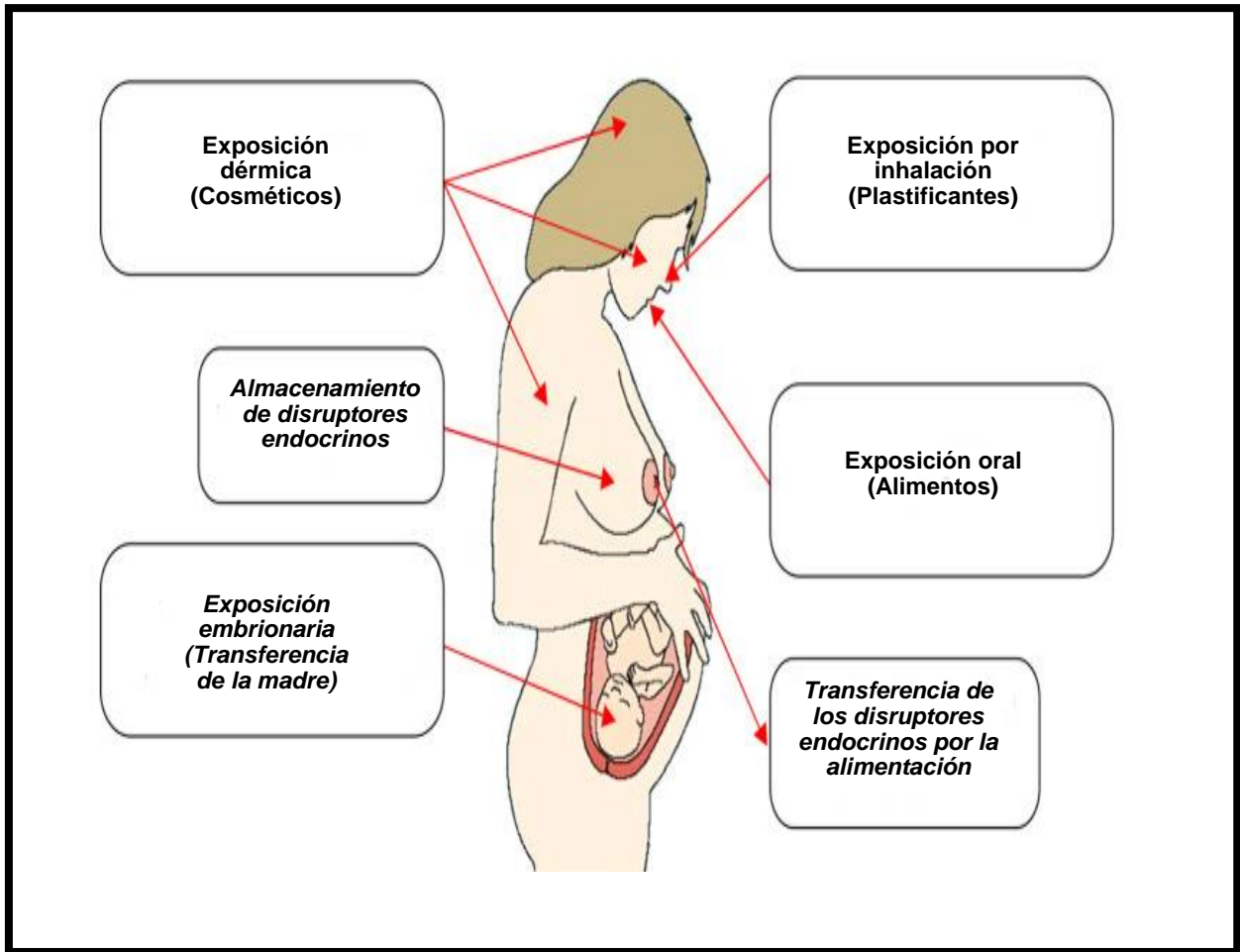
2013).



**Figura 3. Estructura química de los ftalatos.**

Los ftalatos son usados principalmente como plastificantes. A) Estructura general de los ftalatos, los grupos R y R´ pueden ser los mismo o diferentes; tanto alquilos como arilos. Tomado de (Cao, 2010). B) Estructura química del BBP y DBP. Tomado de (Kim *et al.*, 2004).

En distintos estudios se han asociado a los ftalatos con efectos adversos en la salud tanto en humanos como en modelos animales (Ahmad *et al.*, 2014, Romani *et al.*, 2014). La vía de exposición alimentaria es la más importante, principalmente para los neonatos y niños pequeños, quienes son los más vulnerables a los ftalatos debido a su estado crítico de desarrollo y su alto consumo de alimento con respecto a su peso corporal (leche materna y alimentos empacados y envasados; en los cuales se ha comprobado la presencia de estos xenobióticos) (Mankidy *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2015). La exposición persistente a los DE puede traer como consecuencia diferentes problemas principalmente en: el metabolismo (obesidad y diabetes), el desarrollo (atrofia de órganos sexuales) y en la reproducción (reducción de la fertilidad), además puede inducir la aparición o incrementar la progresión de algunos tipos de cáncer (cáncer de seno y de próstata) (Witorsch & Thomas, 2010, Ahmad *et al.*, 2014, Romani *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2015). Esto resulta preocupante, ya que de manera cotidiana las personas están expuestas de diversas formas (ingestión, inhalación, contacto dérmico, entre otras) a este tipo de compuestos (**Figura 4**) (Ahmad *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2015). En estudios *in vitro* se ha demostrado que los disruptores endocrinos pueden generar diversos efectos adversos dependiendo de la línea celular que sea expuesta, estos efectos van desde la estimulación de proliferación celular (Chen & Chien, 2014), la diferenciación celular (Manz *et al.*, 2015), la modulación en la producción de ciertas citocinas (Chighizola & Meroni, 2012) y la pérdida de viabilidad celular (citotóxicidad) (Jones *et al.*, 1975, Benachour & Aris, 2009, Manz *et al.*, 2015).



**Figura 4. Diferentes vías de exposición a DE.**

El ser humano, está expuesto constantemente a los disruptores endocrinos, incluso desde la gestación, a través de la madre. Tomado de (Yang *et al.*, 2015).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Obtención, cultivo y conteo de células hematopoyéticas aisladas de sangre de cordón umbilical.**

La sangre de cordón umbilical se centrifugó a 450xg por 15 min a 25°C. Posteriormente, el paquete globular blanco (ubicado entre el plasma y el paquete de glóbulos rojos) fue recuperado y transferido a un tubo estéril y diluido 1:2 con solución salina de fosfatos (PBS) a pH 7.2. Esta suspensión celular se colocó en un tubo de centrifuga conteniendo previamente 7 mL del reactivo de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Science, Uppsala Sweden) y se centrifugó a 550xg por 15 min a 25°C. Nuevamente el paquete celular blanco fue colectado y lavado dos veces colocando PBS en la suspensión celular hasta completar aproximadamente 10 mL, se centrifugó a 800xg por 20 min a 25°C. Las células mononucleares (CMN) aisladas se resuspendieron en medio de cultivo Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, por sus siglas en inglés, Sigma, St. Louis, MO, USA) al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco Grand Island, NY, USA). Las células se cultivaron en placas de 24 pozos, inoculando  $0.5 \times 10^6$  células/mL en medio de cultivo (IMDM, Sigma) con 10% de SFB, 0.1 mg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina y 0.25 µg/mL de anfotericina B (Sigma). Al medio base se le añadió las siguientes citocinas (IMDMcit): 5 ng/mL de Interleucina-3 (IL-3), 12.5 ng/mL de Interleucina-6 (IL-6), 5 ng/mL de Factor de células seminales (SCF), 5 ng/mL de Ligando del receptor FLt-3 (Flt-3-L) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), 10 ng/mL de Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (FILATIL<sup>®</sup>), 10 ng/mL de Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)

(GRAMAL<sup>®</sup>) y 3 U/mL de Eritropoyetina (Epo) (BIOYETIN<sup>®</sup>) (Probiomed, México DF, México). Las placas se colocaron en una incubadora a 37°C con atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente al 5to día, se llevó a cabo el recambio de la mitad de la suspensión celular por medio IMDMcit nuevo (400xg por 15 min a 25°C) modificado de (De Leon *et al.*, 1998, Mayani *et al.*, 1998). Los cultivos se expusieron a diferentes concentraciones de ftalatos (DBP y BBP) (Sigma) y se colocó una condición sin los xenobióticos (control). El número de células totales fue determinada por el método de exclusión con azul de tripano usando un hematocitómetro (Phelan, 2001, Louis & Siegel, 2011).

## **2.2 Determinación de progenitores hematopoyéticos por medio del ensayo clonogénicos.**

El número de colonias hematopoyéticas fue determinado por cultivo en medio semisólido. Se inocularon 10,000 células mononucleares en 1 mL de medio (MethoCult<sup>®</sup> GF H4434 classic), (StemCell Technologies, Inc. Vancouver British Columbia, Canada) este medio contiene en las siguientes citocinas: 50 ng de SCF, 10 ng de IL-3, 10 ng de CSF-GM y 3 ng de epo. La suspensión celular se transfirió a una caja Petri de 35 mm. Las placas se incuban por 14 días a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los progenitores hematopoyéticos son capaces de generar colonias *in vitro* a las cuales se les denomina Células Formadoras de Colonia (CFC) y también recibe el nombre de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) (Mayani *et al.*, 1998, Flores-Guzman *et al.*, 2006). Las colonias identificadas y cuantificadas por medio del ensayo clonogénico se denominaron como: unidades formadoras de burst de eritroides (UFB-E), unidades formadoras de



granulocitos (UFC-G), unidades formadoras de monocitos (UFC-M), unidades formadoras de granulocitos y monocitos (UFC-GM) o unidades formadoras de multipotentes (UFC-GEMM) (De Leon *et al.*, 1998, Andrade-Zaldivar *et al.*, 2011). Las UFC fueron clasificadas en base a las siguientes propiedades morfológicas: a) UFB-E, colonia que está formando por una o dos agrupaciones de eritoblastos y presentan más de 200 células, b)UFC-G (granulocíticas), colonia que contiene uno o dos agrupaciones con más de 40 granulocitos; c)UFC-M (monocítica) colonia que contiene una o dos agrupaciones con más de 40 monocitos/macrófagos (estos son más grandes y de forma más irregular que las células de linaje granulocítico); d)CFU-GM (granulocito-macrófago) produce una colonia que contiene más de 200 granulocitos y macrófagos; e)UFC-GEMM produce colonias grandes (aproximadamente de 500 células) y contienen células eritroides rodeadas por más de 20 células del linaje granulocito y monocito. (Pereira *et al.*, 2007, Sarma *et al.*, 2010, Wognum *et al.*, 2013).

### **2.3 Análisis estadístico**

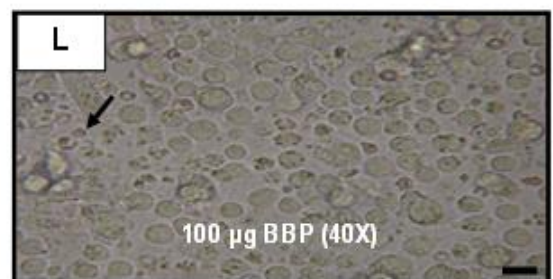
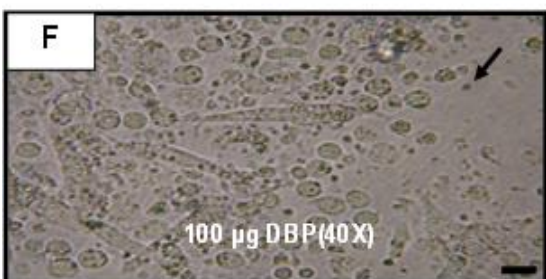
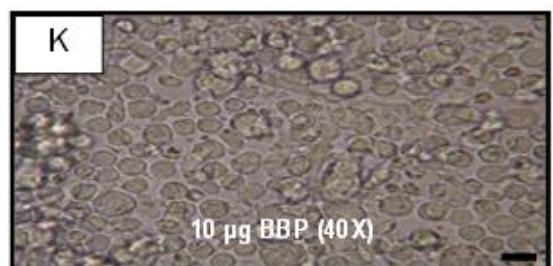
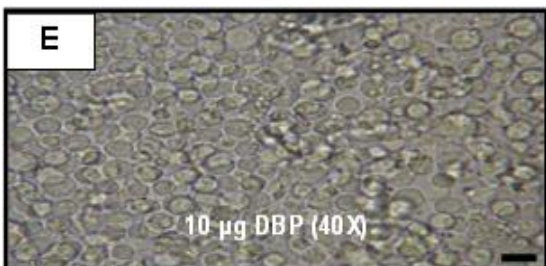
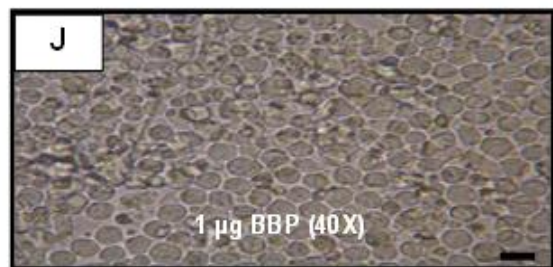
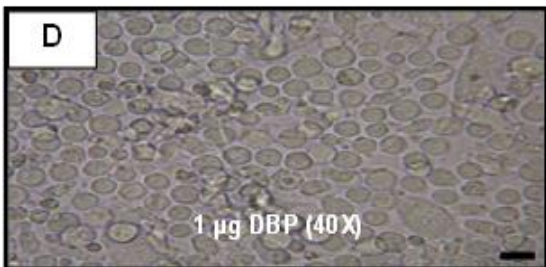
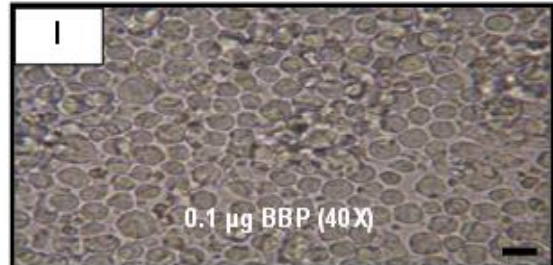
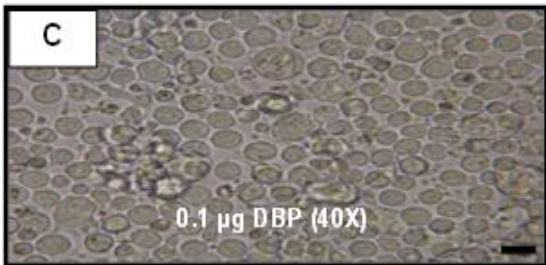
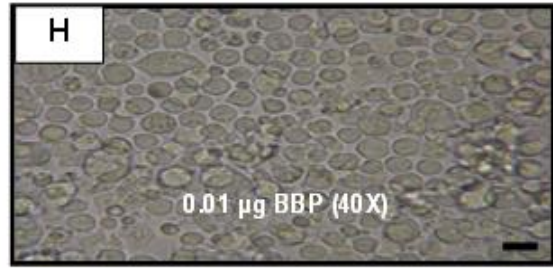
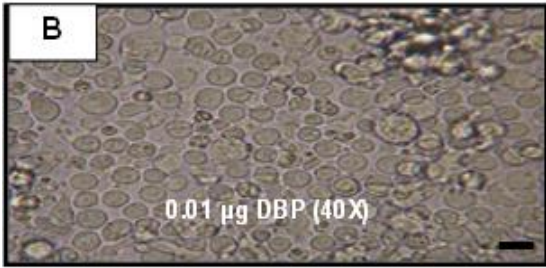
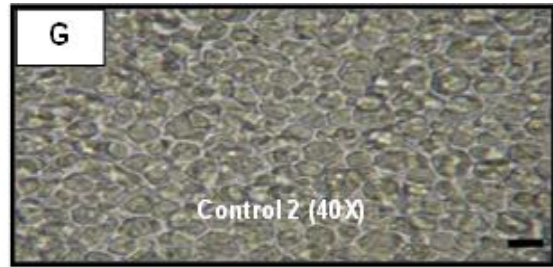
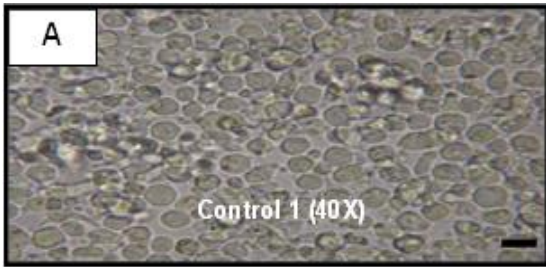
Los datos son presentados como promedio  $\pm$  desviación estándar. La comparación estadística se realizó mediante el ANOVA y el análisis *post hoc* mediante la prueba de Dunnett. Los valores de  $p > 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Efecto de los ftalatos en células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical

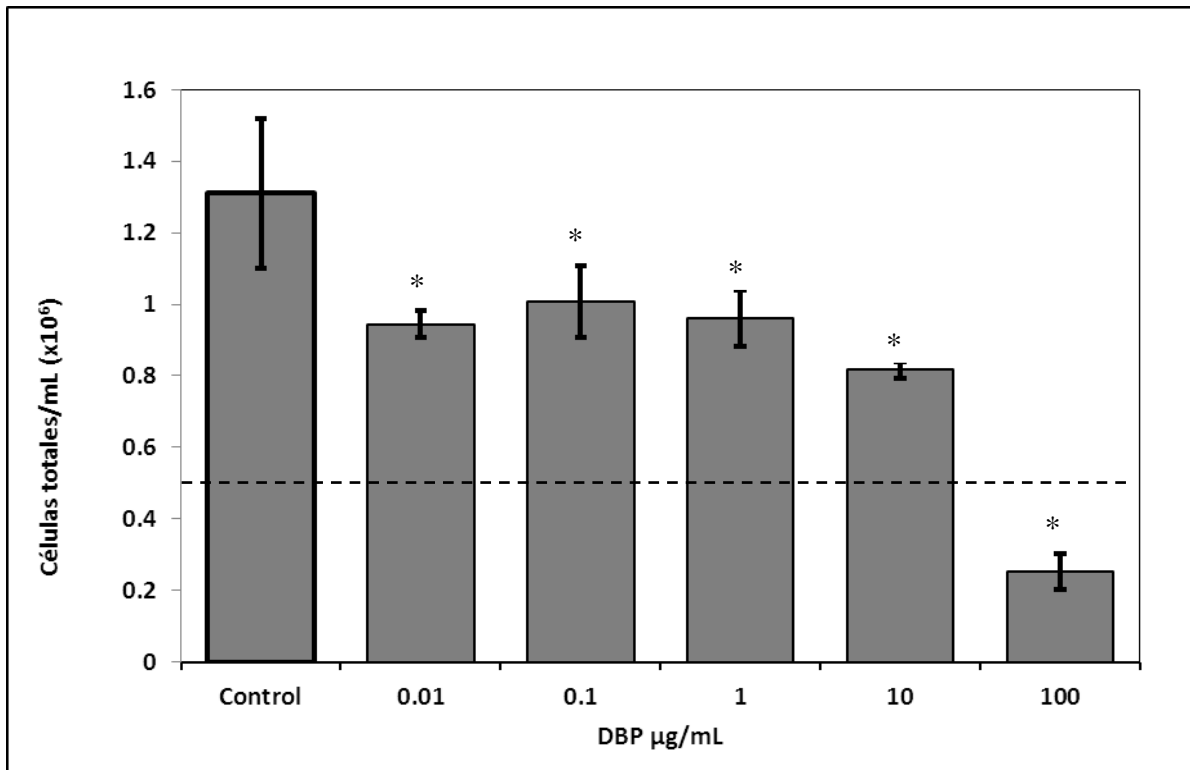
Las células hematopoyéticas aisladas de sangre de cordón umbilical fueron expuestas a concentraciones crecientes de dibutil ftalato (DBP) o bencil-butil ftalato (BBP) a concentraciones de 0.01 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0.01, 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (**Figura 5**). Las muestras se compararon con respecto al control, el cual obtuvo una expansión celular máxima de  $1.31 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^5$  cel/mL. Todas las muestras expuestas a las diferentes concentraciones de DBP, mostraron una reducción estadísticamente significativa en la expansión celular (**Figura 6**). La reducción que se observó, cuando se expusieron a las células a la concentración más baja que era de 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue del 72% ( $0.94 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^4$  cel/mL), mientras que a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tan solo alcanzaron una expansión celular de 19.3% ( $0.25 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4$  cel/mL). En los demás cultivos celulares que fueron expuestos a concentraciones de 0.1, 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se obtuvo una expansión celular máxima de  $1.00 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^5$ ,  $0.96 \times 10^6 \pm 7.0 \times 10^4$  y  $0.81 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^4$  cel/mL, lo que representa un 76.8%, 73.2% y 62.3% respectivamente. Por otro lado las muestras expuestas al BBP a concentraciones en el rango de 0.01 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto al control, y donde se obtuvo una reducción en la expansión celular de entre 77.3%-83.2%, sin embargo cuando las células fueron expuestas a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se observó una disminución en la cantidad, ya que solo se obtuvo una concentración  $0.41 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$  cel/mL,

lo que representa el 31.7% de la expansión celular máxima (**Figura 7**). Estos datos demuestran que la concentración de 100 µg/mL de los dos ftalatos generó un mayor efecto adverso, lo cual es evidente en las **Figura 5 (F y L)**, ya que las células presentan cambios físicos por algún tipo de daño celular.



### **Figura 5. Cultivos de CMN expuestos a ftalatos.**

Se muestran los cultivos de las Células Mononucleares (CMN) hematopoyéticas expuestas a diferentes concentraciones de DBP y BBP durante 14 días. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de contraste de fases invertido a una ampliación de 40X. Las CMN fueron expuestas a DBP a concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (B)-(F) respectivamente y expuestas a BBP a concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (H)-(L) respectivamente. (A) y (G) son controles negativos. La barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican células con posibles daños, por la exposición a los ftalatos.

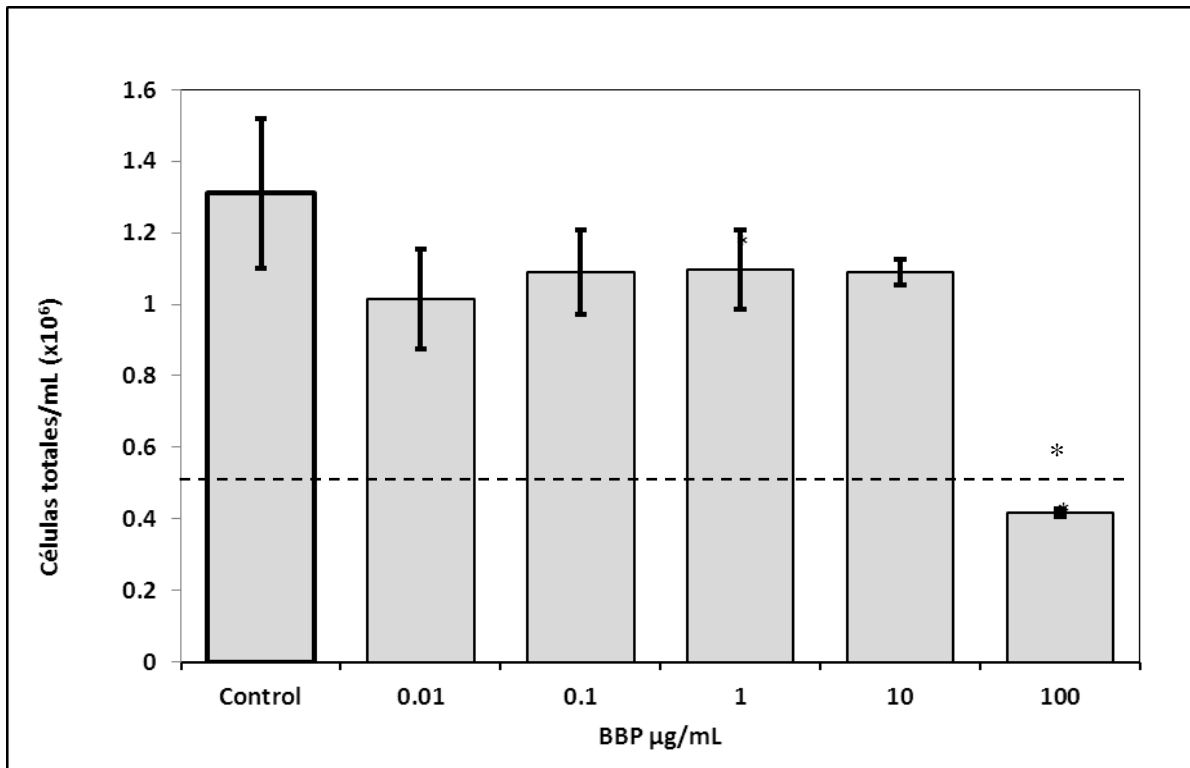


**Figura 6. Expansión celular máxima de las CMN de SCU expuestas a DBP.**

Células Mononucleares hematopoyéticas aisladas de sangre cordón umbilical (SCU) fueron cultivadas en medio IMDM con citocinas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 14 días y expuestas a diferentes concentraciones de Dibutyl Phthalate (DBP).

\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$  entre las diferentes concentraciones de ftalatos evaluadas con respecto al control (n=3).

--- Indica la cantidad de CMN con los que se inició (500,000 células/mL).



**Figura 7. Expansión celular máxima de las células hematopoyéticas de SCU expuestas a BBP.**

Células Mononucleares hematopoyéticas aisladas de sangre cordón umbilical (SCU) fueron cultivadas en medio IMDM con citocinas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 14 días y expuestas a diferentes concentraciones de Benzyl Butyl Phthalate (BBP).

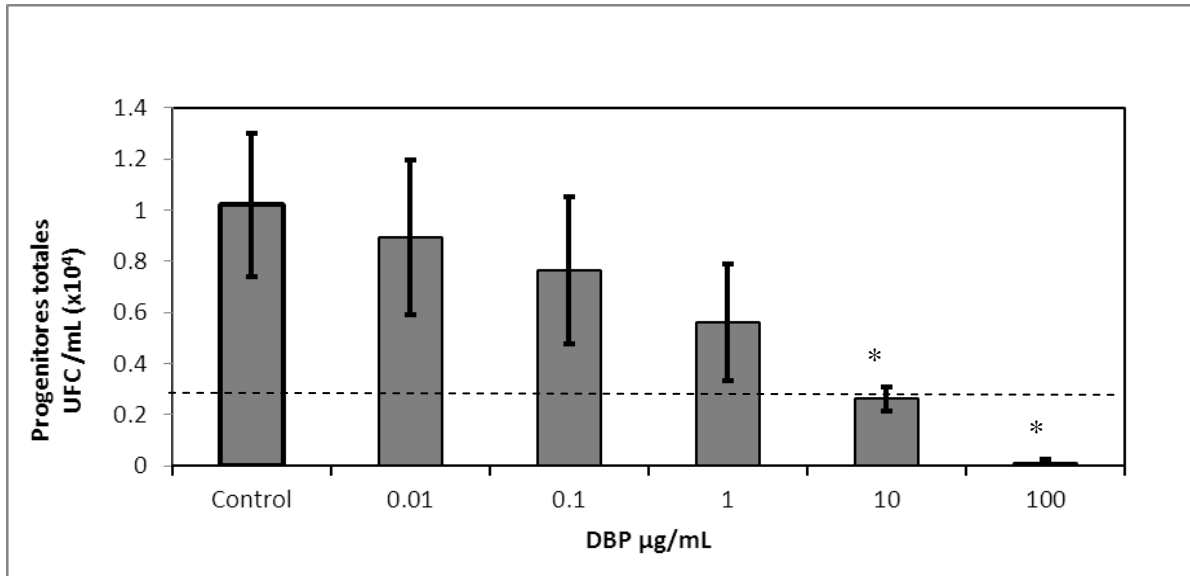
\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$  entre las diferentes concentraciones de ftalatos evaluadas con respecto al control (n=3).

--- Indica la cantidad de CMN con los que se inició (500,000 células/mL).

### **3.2 Efecto de los ftalatos sobre la expansión de las células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical**

Las células progenitoras hematopoyéticas presentes en las CMN de sangre cordón umbilical expuestas las diferentes concentraciones de DBP y BBP fueron evaluadas por medio del ensayo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC), los datos se muestran en la **Figura 8 y 9**, donde se obtuvo en el control  $1.02 \times 10^4 \pm 0.28 \times 10^4$  UFC/mL. Los cultivos expuestos al DBP mostraron una reducción significativa de la cantidad UFC de 74.6% ( $0.26 \times 10^4 \pm 0.04 \times 10^4$  UFC/mL) y 99.1% ( $0.01 \times 10^4 \pm 0.01 \times 10^4$  UFC/mL) a concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (**Figura 8**). Las células que fueron expuestas al BBP solo presentaron diferencia significativa a la concentración 100  $\mu\text{g/mL}$ , ya que se redujo la cuenta de UFC hasta en un 2.9% ( $0.03 \times 10^4 \pm 0.03 \times 10^4$  UFC/mL). De acuerdo a estos resultado se deduce que el DBP presenta mayor toxicidad que el BBP, además que a la concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  de cualquiera de los dos compuestos se redujo la cantidad de progenitores hasta en casi un 99.1% y 97.1%, respectivamente demostrándose el mayor efecto tóxico de dichos compuestos a esta concentración (**Figura 8 y 9**). En la **Figura 10** se muestra la morfología característica de los UFC obtenidos mediante el ensayo clonogénico cultivadas en el medio semisólido MethoCult<sup>®</sup> GF H4434 classic.



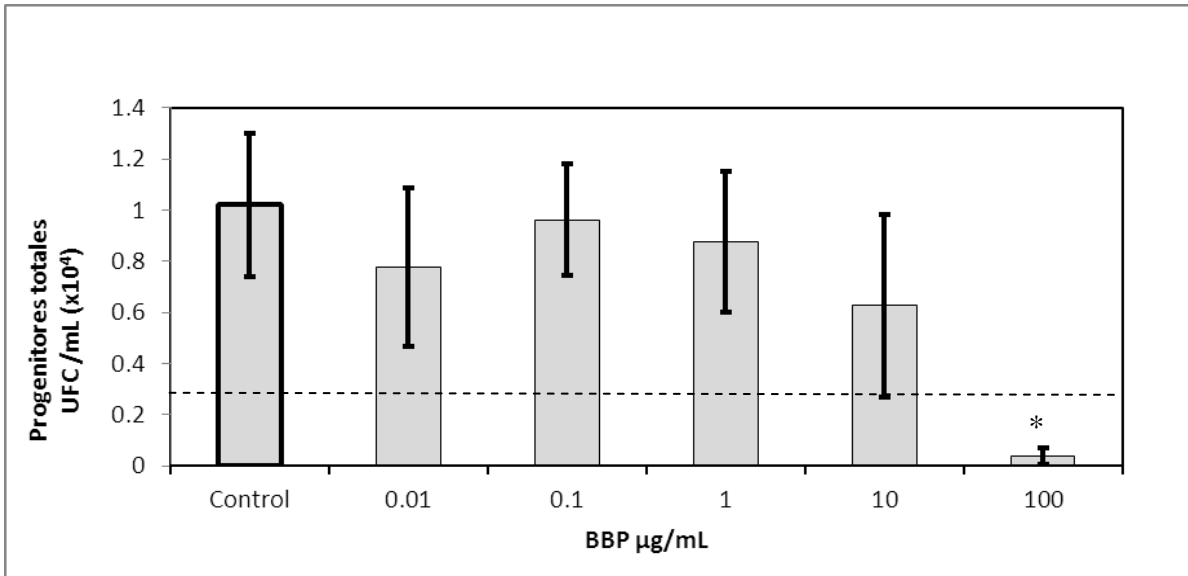


**Figura 8. Expansión de progenitores hematopoyéticos totales expuestos a DBP.**

Células Mononucleares hematopoyéticas aisladas de sangre cordón umbilical (SCU) fueron cultivadas en medio IMDM con citocinas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 14 días y expuestas a diferentes concentraciones de Dibutyl Phthalate (DBP).

\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$  entre las diferentes concentraciones de ftalatos evaluadas con respecto al control (n=3).

--- La línea discontinua indica la cantidad de progenitores con los que se inició de 3000 UFC/mL.

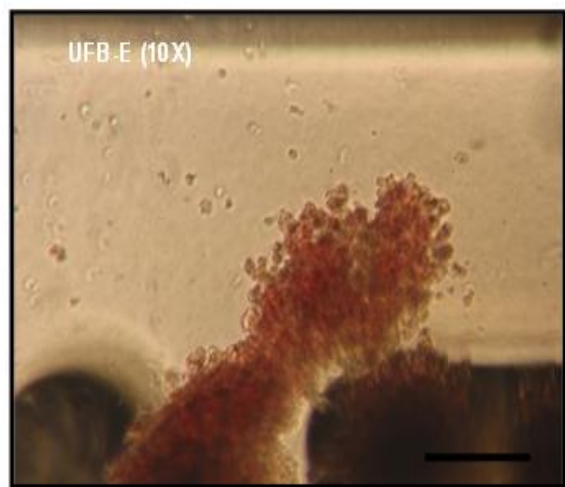
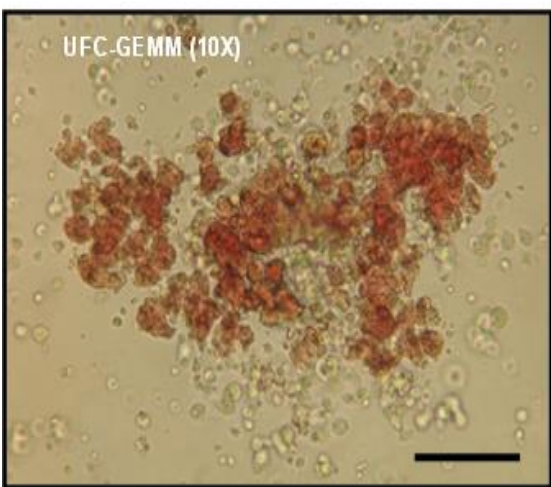
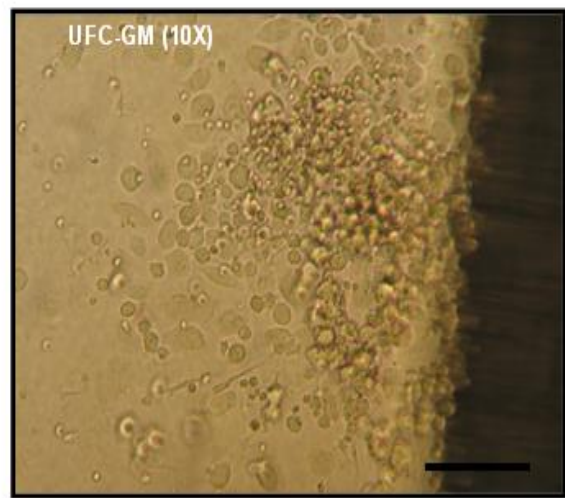
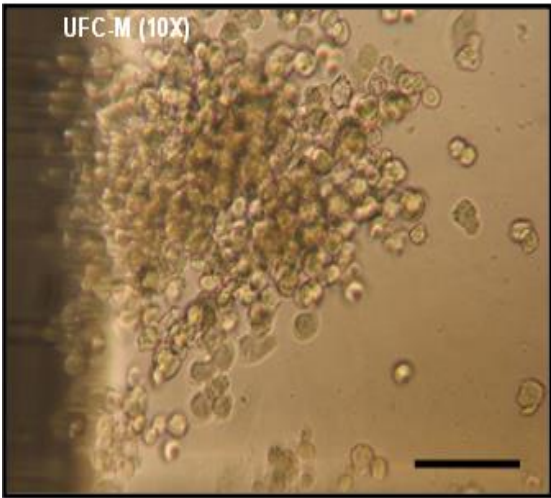
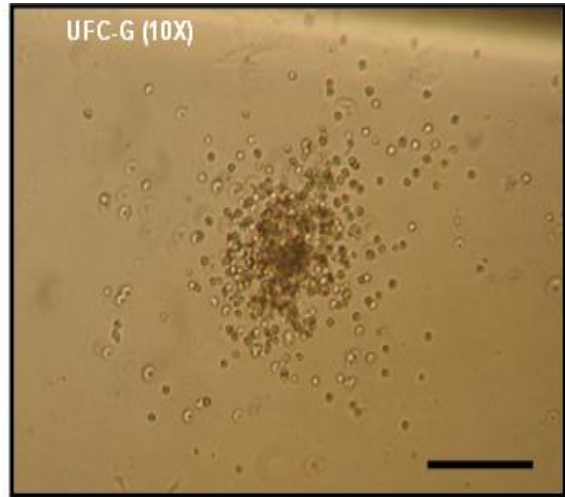
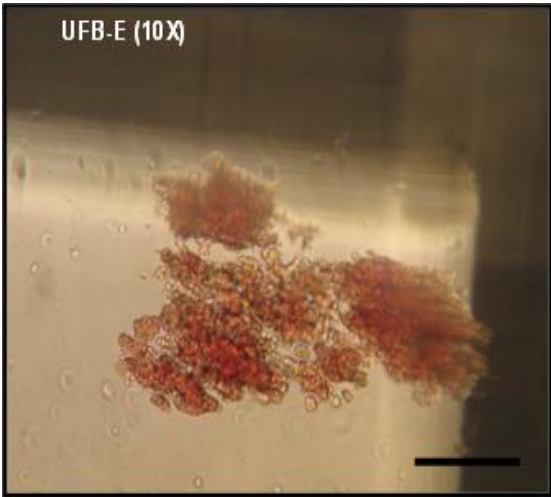


**Figura 9. Expansión de progenitores hematopoyéticos totales expuestos a BBP.**

Células Mononucleares hematopoyéticas aisladas de sangre cordón umbilical (SCU) fueron cultivadas en medio IMDM con citocinas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 14 días y expuestas a diferentes concentraciones de Benzyl Butyl Phthalate (BBP).

\*Indica diferencias significativas  $p < 0.05$  entre las diferentes concentraciones de ftalatos evaluadas con respecto al control (n=3).

--- La línea discontinua indica la cantidad de progenitores con los que se inició de 3000 UFC/mL.



### **Figura 10. Progenitores hematopoyéticos obtenidos mediante el ensayo clonogénico.**

Las imágenes muestran representativamente, diferentes unidades formadoras de colonia (UFC) derivadas de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical cultivados en MethoCult® GF H4434 classic, después de 14 días de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

a) UFB-E, colonia que está formando por una o dos agrupaciones de eritoblastos y presentan más de 200 células, b) UFC-G (granulocíticas), colonia que contiene uno o dos agrupaciones con más de 40 granulocitos; c) UFC-M (monocítica) colonia que contiene una o dos agrupaciones con más de 40 monocitos/macrófagos ( estos son más grandes y de forma más irregular que las células de linaje granulocítico); d)CFU-GM (granulocito-macrófago) produce una colonia que contiene más de 200 granulocitos y macrófagos; e) UFC-GEMM produce colonias grandes (aproximadamente de 500 células) y contienen células eritroides rodeadas por más de 20 células del linaje granulocito y monocito. Todas las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido de contraste de fases a una ampliación de 10X. La barra de escala =100 µm.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Efecto de los ftalatos en células hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical

Existen varios estudios donde se demostró los efectos adversos; que producen los disruptores endocrinos sobre diversas líneas celulares. Andersen *et al.*, (1999) llevaron a cabo un trabajo donde se relacionó al DBP y al BBP como disruptores endocrinos, debido a su interacción con los receptores estrogénicos. Recientemente se reportó que al exponer por 48 horas a la línea celular MCF-7, a concentraciones entre 0.002-2.78 y 0.003-3.12  $\mu\text{g/mL}$  de DBP y BBP respectivamente, se promueve su proliferación, sin embargo cuando se exponen a concentraciones de 27.8 y 31.2  $\mu\text{g/mL}$  de DBP y BBP respectivamente, se produce un efecto citotóxico, el cual se ve reflejado en el decremento de la cantidad de células evaluadas con respecto al control (Chen & Chien, 2014). En otro estudio se demostró que el ftalato DEHP, es tóxico para las células de leucemia promielocítica a concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$ , no obstante a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  no se observa un efecto letal, sin embargo se demostró que hay una alteración en el proceso de migración de estas células (Manz *et al.*, 2014). Además recientemente este mismo grupo de investigadores reportó que progenitores hematopoyéticos (CPH) expuestos a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  de DEHP durante 24 horas, reducen la migración de las células hasta en un 70% y además se observó un incremento en la apoptosis de hasta 0.49 veces con respecto al control (Manz *et al.*, 2015) esto resulta preocupante; ya que para que un trasplante sea considerado exitoso, las células hematopoyéticas y

progenitores tienen que migrar al estroma de la médula ósea e injertarse (Delaney *et al.*, 2010). En otro estudio utilizando la línea celular B4G12 derivada de células endoteliales de córnea, se demostró que exponiendo estas células a concentraciones de 13.9  $\mu\text{g}$  y 15.6  $\mu\text{g}$  de DBP y BBP respectivamente provocaban una disminución en la viabilidad celular, sin embargo cuando son expuestas a concentraciones menores, aun se ven afectadas, pues hay un incremento en los niveles de producción de las citocinas IL-1, IL-8 e IL-6 (Kruger *et al.*, 2012). En otro estudio se demostró que en macrófagos expuestos al disruptor endocrino bisfenol-A a concentraciones de 222 y 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se produjo un incremento en la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$ . En un estudio realizado por Benachour & Aris (2009) demostraron que células aisladas de placenta humana que fueron expuestas a diferentes concentraciones (desde 0.0002 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de bisfenol-A, presentaron efectos citotóxicos adversos (que iban desde el incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , hasta la pérdida de viabilidad celular). Esto es realmente preocupante ya que en el caso del bisfenol-A se han encontrado concentraciones de hasta 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en sangre periférica de mujeres embarazadas (Padmanabhan *et al.*, 2008). En el caso de los ftalatos, se han encontrado en muestras de sangre de cordón umbilical a concentraciones de 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en el caso de DBP y de 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el BBP (Huang *et al.*, 2014). Lo que demuestra que durante la etapa prenatal, el ser humano está expuesto a concentraciones perjudiciales de este tipo de contaminantes, por ello es muy importante tratar de dilucidar el efecto de estos compuestos sobre las células progenitoras hematopoyéticas y las implicaciones biológicas y clínicas que conllevan. Todos los datos expuestos anteriormente sustentan lo observado en el presente trabajo, que demostró el efecto citotóxico a

ciertas concentraciones de los ftalatos DBP y BBP, sobre las células hematopoyéticas humanas aisladas de cordón umbilical; dado que a concentraciones de 100 µg/mL tanto el DBP y BBP presentaron la mayor toxicidad produciendo una reducción en la viabilidad de las células (**Figura 6 y 7**). El DBP resultó ser el más tóxico entre los dos compuestos ensayados; ya que como se observa en el **Figura 6**, todas las concentraciones de DBP evaluadas, presentaron una disminución de la cantidad de células con respecto al control, sin embargo en el caso del BBP a concentraciones más bajas de 100 µg/mL, no presentaron toxicidad tal y como se observa en la **Figura 7**, Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estas células pudieran sufrir algún tipo de alteración; ya que como se ha mencionado anteriormente, los disruptores endocrinos pueden producir diversos efectos adversos, que van desde el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias (Chighizola & Meroni, 2012), inhibición de la migración celular (Manz *et al.*, 2015), hasta la pérdida de viabilidad celular (Jones *et al.*, 1975, Benachour & Aris, 2009, Manz *et al.*, 2015), dependiendo de las concentraciones a las cuales las células son expuestas.

#### **4.2 Efecto de los ftalatos en células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical**

El ensayo de UFC se ha usado frecuentemente por laboratorios de terapia clínica, para medir el contenido de células progenitoras hematopoyéticas; tanto en muestras de médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical, las cuales generalmente son usadas en trasplantes de células seminales hematopoyéticas. Gracias a este ensayo se puede conocer el número e integridad

de los progenitores hematopoyéticos, luego de los distintos procesos a los que frecuentemente son sometidas (reducción del volumen por el método de gradiente de densidad con ficoll, remoción de los eritrocitos, criopreservación y descongelación) (Pereira *et al.*, 2007, Sarma *et al.*, 2010, Wognum *et al.*, 2013). Además el ensayo de UFC permite realizar pruebas de toxicidad, de diversos compuestos (entre los que destacan nuevos medicamentos en estudios preclínicos (Pereira *et al.*, 2007, Sarma *et al.*, 2010, Wognum *et al.*, 2013), o de compuestos orgánicos de los cuales se sospeche presenten efectos hematotóxicos (Croera *et al.*, 2008, Wei *et al.*, 2016). En un estudio reciente donde se utilizó el ensayo UFC, se comprobó el efecto hematotóxico del formaldehído sobre progenitores hematopoyéticos de medula ósea de ratones que fueron expuestos a este contaminante por vía aérea (Wei *et al.*, 2016). Además en otro reporte se logró comprobar por medio del mismo ensayo, el efecto del naftaleno y sus metabolitos sobre progenitores hematopoyéticos aislados de cordón umbilical (Croera *et al.*, 2008). En dicho trabajo se observó que el naftaleno por sí solo no producen efecto adversos a una concentración de hasta 640 µg/mL, no obstante los metabolitos derivados de este; la 1,4-naftoquinona, el naftol-1, y el naftol-2, si causaron un efecto hematotóxico sobre los progenitores hematopoyéticos a concentraciones de 0.3, 23.9 y 51.18 µg/mL respectivamente, dado que se observó un decremento en la cantidad de UFC encontradas en las muestras expuestas, con respecto al control. Es importante mencionar que el naftaleno es el precursor principal, para la síntesis de los ftalatos y que ha sido fuertemente relacionado con efectos carcinogénicos en modelos animales (Croera *et al.*, 2008). Belles-Isles *et al* (2002) llevaron a cabo un estudio donde



relacionaron, la exposición de xenobióticos, con la disminución de linfocitos aislados de sangre de cordón umbilical de madres expuestas.

Como se ha mencionado anteriormente, una gran cantidad de sustancias tienen la capacidad de cruzar a través de la placenta y llegar a la sangre del cordón umbilical (Croera *et al.*, 2008). Uno de entre tantos compuestos son los ftalatos estudiados en este trabajo, ya que se han encontrado en concentraciones de hasta 0.02 y 0.03  $\mu\text{g/mL}$ , lo que resulta interesante ya que, como se puede apreciar en las **Figuras 8 y 9**, las concentraciones de 0.01 y 0.1  $\mu\text{g/mL}$  de DBP y BBP no presentaron efecto adversos sobre los progenitores hematopoyéticos; ya que se obtuvo una cantidad muy similar de UFC en los dos casos con respecto al control, sin embargo diversos trabajos confirman que la exposición a disruptores endocrinos, pueden inducir el incremento en la expresión de diversas citocinas (Chighizola & Meroni, 2012, Liu *et al.*, 2014, Kovats, 2015). Cuando se ensayaron concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , tanto de DBP y BBP, se observó una disminución en la cantidad de progenitores hematopoyéticos (**Figura 8 y 9**). Singh & Li (2011), quienes mencionan que aproximadamente 249 genes/proteínas están relacionadas con los efectos provocados por la exposición a los ftalatos y de los cuales 34 son propuestos como posibles biomarcadores ya que están directamente implicadas en el desarrollo de una cantidad considerable de patologías que afectan principalmente al corazón, el hígado y los riñones. De los 34 genes/proteínas destacan los siguientes receptores: PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), ESR (estrogen receptor), AR (Androgen receptor), y AHR (Aryl hydrocarbon receptor) (Singh & Li, 2011). Algo que cabe resaltar es que las células hematopoyéticas aisladas de cordón umbilical no expresan los

receptores ESR (Igarashi *et al.*, 2001, Kovats, 2015), por lo que no está claro el mecanismo mediante el cual los ftalatos pueden estar ejerciendo el efecto observado, por esta razón es importante seguir estudiando y conocer los efectos adversos de los ftalatos a concentraciones no letales y además determinar el mecanismo de interacción entre los ftalatos y los progenitores hematopoyéticos y las implicaciones clínicas que pudieran producir.

## 5. CONCLUSIONES

- La presencia de diferentes concentraciones de los ftalatos: dibutil ftalato (DBP) y bencil-butiril ftalato (BBP), afectan la expansión *in vitro* de células mononucleares (CMN) humanas, aisladas de cordón umbilical.
- EL DBP y BBP afecta la morfología y viabilidad de las CNM expuestas a concentraciones de 100 µg/mL.
- La exposición DBP y BBP afecto la expansión de los progenitores hematopoyéticos, reduciendo la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) encontradas en los ensayos clonogénicos.
- El DBP presentó mayor citotóxicidad con respecto al BBP, tanto en CMN como en progenitores hematopoyéticos
- Los ftalatos son citotóxicos para las CMN y los progenitores hematopoyéticos humanos cultivados *in vitro*.

## 6. PERSPECTIVAS

- Medir la cantidad de ftalatos contenidos en las muestras de sangre y suero de los cordones umbilicales, que son donados y evaluar el riesgo de la población mexicana a la exposición de este tipo de compuestos tóxicos, datos que ayudarían a regular su uso en la vida cotidiana.
- Realizar el estudio del contenido de ftalatos en los materiales plásticos que se utilizan en el cultivo *in vitro* y para la transfusión de las células hematopoyéticas humanas.
- Llevar a cabo estudios moleculares; como la expresión diferencial de genes (principalmente sobre citocinas y receptores) que pudieran verse afectados por la exposición de los ftalatos.
- También es recomendable realizar análisis proteómico de las células hematopoyéticas al ser expuestas a los ftalatos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad R, Gautam AK, Verma Y, Sedha S & Kumar S (2014) Effects of in utero di-butyl phthalate and butyl benzyl phthalate exposure on offspring development and male reproduction of rat. *Environmental science and pollution research international* **21**: 3156-3165.
- Ahmed SA (2000) The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* **150**: 191-206.
- Andersen HR, Andersson AM, Arnold SF, *et al.* (1999) Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental health perspectives* **107 Suppl 1**: 89-108.
- Andrade-Zaldivar H, Santos L & De Leon Rodriguez A (2008) Expansion of human hematopoietic stem cells for transplantation: trends and perspectives. *Cytotechnology* **56**: 151-160.
- Andrade-Zaldivar H, Kalixto-Sanchez MA, de la Rosa AP & De Leon-Rodriguez A (2011) Expansion of human hematopoietic cells from umbilical cord blood using roller bottles in CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>-free atmosphere. *Stem cells and development* **20**: 593-598.
- Andrade-Zaldívar H, Kalixto-Sánchez MA, Barba de la Rosa AP & De León-Rodríguez A (2014) Expansion of CD34+ human hematopoietic cells from umbilical cord blood using roller bottles. *Revista mexicana de ingeniería química* **13**: 379-385.
- Appelbaum FR (2007) Hematopoietic-cell transplantation at 50. *The New England journal of medicine* **357**: 1472-1475.
- Belles-Isles M, Ayotte P, Dewailly E, Weber J-P & Roy R (2002) Cord blood lymphocyte functions in newborns from a remote maritime population exposed to organochlorines and methylmercury. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **65**: 165-182.
- Benachour N & Aris A (2009) Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicology and applied pharmacology* **241**: 322-328.
- Broxmeyer HE & Smith FO (2009) Cord Blood Hematopoietic Cell Transplantation. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*, p. 559-576. Wiley-Blackwell.
- Cao XL (2010) Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety* **9**: 21-43.
- Chen FP & Chien MH (2014) Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society* **17**: 377-384.
- Chen X, Xu S, Tan T, Lee ST, Cheng SH, Lee FW, Xu SJ & Ho KC (2014) Toxicity and estrogenic endocrine disrupting activity of phthalates and their mixtures. *International journal of environmental research and public health* **11**: 3156-3168.
- Chighizola C & Meroni PL (2012) The role of environmental estrogens and autoimmunity. *Autoimmunity reviews* **11**: A493-501.
- Croera C, Ferrario D & Gribaldo L (2008) In vitro toxicity of naphthalene, 1-naphthol, 2-naphthol and 1,4-naphthoquinone on human CFU-GM from female and male cord blood donors. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **22**: 1555-1561.
- De Leon A, Mayani H & Ramirez OT (1998) Design, characterization and application of a mini-bioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions. *Cytotechnology* **28**: 127-138.

- Delaney C, Ratajczak MZ & Laughlin MJ (2010) Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients. *Expert review of hematology* **3**: 273-283.
- Domen J, Wagers A & Weissman IL (2006) 2. Bone marrow (Hematopoietic) stem cells. *Regenerative medicine* **13**.
- Flores-Guzman P, Martinez-Jaramillo G, Montesinos JJ, Valencia I & Mayani H (2006) Growth kinetics of progenitor cell-enriched hematopoietic cell populations in long-term liquid cultures under continuous removal of mature cells. *Cytotherapy* **8**: 299-307.
- Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, *et al.* (1997) Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *The New England journal of medicine* **337**: 373-381.
- Granick JL, Simon SI & Borjesson DL (2012) Hematopoietic stem and progenitor cells as effectors in innate immunity. *Bone marrow research* **2012**: 165107.
- Hequet O (2015) Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. *Journal of blood medicine* **6**: 55-67.
- Horowitz MM (2009) Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*, p. 15-21. Wiley-Blackwell.
- Huang Y, Li J, Garcia JM, *et al.* (2014) Phthalate levels in cord blood are associated with preterm delivery and fetal growth parameters in Chinese women. *PloS one* **9**: e87430.
- Igarashi H, Kouro T, Yokota T, Comp PC & Kincade PW (2001) Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 15131-15136.
- Jalova V, Jarosova B, Blaha L, Giesy JP, Ocelka T, Grabic R, Jurcikova J, Vrana B & Hilscherova K (2013) Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environment international* **59**: 372-383.
- Jones AE, Kahn RH, Groves JT & Napier EA, Jr. (1975) Phthalate ester toxicity in human cell cultures. *Toxicology and applied pharmacology* **31**: 283-289.
- Kelley JM & Daley GQ (2013) Hematopoietic defects and iPSC disease modeling: lessons learned. *Immunology letters* **155**: 18-20.
- Kim IY, Han SY & Moon A (2004) Phthalates inhibit tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of toxicology and environmental health Part A* **67**: 2025-2035.
- Koestenbauer S, Zisch A, Dohr G & Zech NH (2009) Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell transplantation* **18**: 1059-1068.
- Kovats S (2015) Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology* **294**: 63-69.
- Kruger T, Cao Y, Kjaergaard SK, Knudsen LE & Bonfeld-Jorgensen EC (2012) Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4G12. *International journal of toxicology* **31**: 364-371.
- Kurnaz F & Kaynar L (2015) Peripheral blood stem cell mobilization failure. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*.

- Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI & Sugiyama D (2013) Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem cell research & therapy* **4**: 71.
- Lin S, Ku HY, Su PH, Chen JW, Huang PC, Angerer J & Wang SL (2011) Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan. *Chemosphere* **82**: 947-955.
- Liu Y, Mei C, Liu H, Wang H, Zeng G, Lin J & Xu M (2014) Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochemical and biophysical research communications* **451**: 592-598.
- Louis KS & Siegel AC (2011) Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **740**: 7-12.
- Mankidy R, Wiseman S, Ma H & Giesy JP (2013) Biological impact of phthalates. *Toxicology letters* **217**: 50-58.
- Manz P, Cadeddu RP, Wilk M, Fritz B, Haas R & Wenzel F (2014) Impact of Di(2-ethylhexyl)phthalate on migration rate of human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Clinical hemorheology and microcirculation* **58**: 241-246.
- Manz P, Cadeddu RP, Wilk M, Fischer JC, Fritz B, Haas R & Wenzel F (2015) Influence of Di(2-ethylhexyl)phthalate on migration rate and differentiation of human hematopoietic stem and progenitor cells (CD34+). *Clinical hemorheology and microcirculation* **61**: 111-118.
- Mayani H, Gutierrez-Rodriguez M, Espinoza L, Lopez-Chalini E, Huerta-Zepeda A, Flores E, Sanchez-Valle E, Luna-Bautista F, Valencia I & Ramirez OT (1998) Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **16**: 127-135.
- Moalic V (2013) Mobilization and collection of peripheral blood stem cells in healthy donors: risks, adverse events and follow-up. *Pathologie-biologie* **61**: 70-74.
- Olujimi O, Fatoki O, Odendaal J & Okonkwo J (2010) Endocrine disrupting chemicals (phenol and phthalates) in the South African environment: A need for more monitoring. *Water SA* **36**: 671-682.
- Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L & Kannan K (2008) Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* **28**: 258-263.
- Pereira C, Clarke E & Damen J (2007) Hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **407**: 177-208.
- Phelan MC (2001) Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, p. ^pp. John Wiley & Sons, Inc.
- Rieger MA & Schroeder T (2012) Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**.
- Romani F, Tropea A, Scarinci E, Federico A, Dello Russo C, Lisi L, Catino S, Lanzone A & Apa R (2014) Endocrine disruptors and human reproductive failure: the in vitro effect of phthalates on human luteal cells. *Fertility and sterility* **102**: 831-837.
- Sarma NJ, Takeda A & Yaseen NR (2010) Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Singh S & Li SS (2011) Phthalates: toxicogenomics and inferred human diseases. *Genomics* **97**: 148-157.

- Smith C (2003) Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* **10**: 9-16.
- Thomas TE, Abraham SJ & Lansdorp PM (2002) Flow cytometry and immunoselection of human stem cells. *Methods in molecular medicine* **63**: 29-57.
- Torok-Storb B (1988) Cellular interactions. *Blood* **72**: 373-385.
- Wang YC, Chen HS, Long CY, Tsai CF, Hsieh TH, Hsu CY & Tsai EM (2012) Possible mechanism of phthalates-induced tumorigenesis. *The Kaohsiung journal of medical sciences* **28**: S22-27.
- Wei C, Wen H, Yuan L, McHale CM, Li H, Wang K, Yuan J, Yang X & Zhang L (2016) Formaldehyde induces toxicity in mouse bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells and enhances benzene-induced adverse effects. *Archives of toxicology*.
- Wielogorska E, Elliott CT, Danaher M & Connolly L (2015) Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **29**: 211-220.
- Witorsch RJ & Thomas JA (2010) Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature. *Critical reviews in toxicology* **40 Suppl 3**: 1-30.
- Wognum B, Yuan N, Lai B & Miller CL (2013) Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **946**: 267-283.
- Yang O, Kim HL, Weon JI & Seo YR (2015) Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *Journal of cancer prevention* **20**: 12-24.
- Yesilipek MA (2014) Hematopoietic stem cell transplantation in children. *Turk pediatri arsivi* **49**: 91-98.
- Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR & Matthews JB (1998) Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **46**: 282-293.