



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES  
HUMANAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL EN PRESENCIA DE  
DIETIL FTALATO, DIETILHEXIL FTALATO Y DIISONONIL FTALATO**

Tesis que presenta

**I.B.T. José Manuel Flores Kelly**

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 2017



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Evaluación de la expansión de células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical en presencia de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Manuel Flores Kelly** y aprobada el veinticuatro de noviembre del dos mil diecisiete 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

**Dr. Carlos Barajas López**  
Miembro del Comité Tutorial

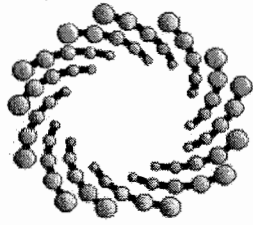
**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**  
Miembro del Comité Tutorial



## **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 591428 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 174 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 24 días del mes de noviembre del año 2017, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Carlos Barajas López</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</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.

**José Manuel Flores Kelly**

sobre la Tesis intitulada:

*Evaluación de la expansión de células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical en presencia de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato*

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 11:00 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 24 días del mes de noviembre de 2017.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

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



## **Dedicatorias**

*Dedico este trabajo a toda mi familia, en especial a mi madre que siempre ha estado apoyándome en mi camino y a mi padre que aunque ya no estará para verlo fue motivo para seguir adelante.*

## Agradecimientos

*Al Dr. Antonio De León Rodríguez por haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo y por asesorarme en mi trabajo de tesis.*

*A los doctores Carlos Barajas López y Rubén Hipólito López Revilla por formar parte del comité tutorial, por las sugerencias y comentarios para la mejora del presente trabajo.*

*Al Dr. Víctor Balderas por el apoyo técnico y administrativo.*

*A la Sra. Sonia por su apoyo en la limpieza y esterilización del material del laboratorio.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.*

*A mis amigos y compañeros de la generación 2015-2017 (Alain, Daniel, Diana, Faby, Fermín, Fitzya, Gabriel, Gaby, Grecia, Jess, Joel, Marce, Moni Monse, Moni Gaby y Paulina).*

*A mis amigos del Laboratorio 4 los cuales me ayudaron mucho desde que comencé con mi proyecto de tesis, con ellos aprendí muchas cosas, tanto en lo académico como en lo personal, gracias a ellos tuve una estancia placentera a pesar del estrés del día a día (Víctor, Ana Karen, Gil, Sergio Calderón, Joel, Sergio Cisneros, Ángel, Marco, Cecy, Esaú, César, David Zermeño, David Huerta, Katty, Pris, Abraham, Luz y Karen Bravo).*

*A los doctores de la División de Biología Molecular por la formación académica brindada en clases.*

*Al área de posgrado por apoyarme en los trámites necesarios para la realización de mi trabajo de tesis.*

*A todos mis amigos, en especial a Karen Galindo y Gaby Ruiz por ser mis compañeras de casa. Además, a todos aquellos que me estuvieron apoyando en esta etapa.*

*A todas aquellas personas que conocí dentro del instituto de otros laboratorios, divisiones y áreas y al igual a aquellas personas que conocí fuera del instituto durante mi estancia en el IPICYT.*

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	ii
<b>Créditos institucionales</b>	iii
<b>Dedicatorias</b>	v
<b>Agradecimientos</b>	vi
<b>Lista de figuras</b>	ix
<b>Resumen</b>	x
<b>Abstract</b>	xi
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	4
2.1 Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato	4
2.2 Ensayos clonogénicos de las cinéticas de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato	5
2.3 Análisis estadísticos	5
<b>3 RESULTADOS</b>	6
3.1 Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato	6
3.2 Ensayos clonogénicos de las cinéticas de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato	9
<b>4 DISCUSIÓN</b>	14
4.1 Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato	14
4.1 Ensayos clonogénicos de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato	16
<b>5 CONCLUSIONES</b>	17
<b>6 PERSPECTIVAS</b>	18
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b>	19



## Lista de figuras

- Fig. 1. Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato al día 14 de incubación 10
- Fig. 2. Cinética de los ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato 11
- Fig. 3. Células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical en el día 14 de cultivo de los ensayos de inocuidad 12
- Fig. 4. Ensayos clonogénicos de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato 13

# Resumen

## **Evaluación de la expansión de células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical en presencia de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato**

Los ftalatos son ésteres de ácido ftálico usados industrialmente como aditivos plásticos ya que les confieren a los materiales las propiedades físicas deseadas como flexibilidad y durabilidad. Sin embargo, los ftalatos no se unen químicamente al polímero y por lo tanto pueden liberarse al medio que los rodea. Pueden causar daño celular mediado por la interacción con receptores nucleares y la secreción de citocinas proinflamatorias. Se realizaron ensayos de inocuidad para medir la viabilidad de las células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical en presencia de dietil ftalato (DEP), dietilhexil ftalato (DEHP) y diisononil ftalato (DINP). Adicionalmente, se analizó el efecto de estos compuestos sobre la expansión de los progenitores hematopoyéticos mediante ensayos clonogénicos. En los ensayos de inocuidad se observó que en los cultivos tratados con 10 y 100 µg/ml de DEHP y DINP presentaron una disminución significativa en la viabilidad celular. En los ensayos clonogénicos se observó que en los cultivos tratados con 100 µg/ml de DEHP y DINP presentaron una disminución significativa en la formación de colonias. En cambio, los cultivos expuestos a DEP en ambos ensayos no presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, los ftalatos analizados sí ejercen un efecto negativo en la viabilidad celular, siendo el DEP menos tóxico que el DEHP y el DINP. Palabras clave. plastificador, DEHP, DEP, DINP, disruptor endócrino, toxicidad, progenitores hematopoyéticos.

## **Abstract**

### **Evaluation of the expansion of human cord blood mononuclear cells in the presence of diethyl phthalate, diethylhexyl phthalate and diisononyl phthalate**

Phthalates are esters of phthalic acid used industrially as plastic additives since they confer to the materials desired physical properties such as flexibility and durability. However, phthalates are not chemically linked to the polymer and therefore can be released to the surrounding environment. They can cause cellular damage mediated by interaction with nuclear receptors and secretion of proinflammatory cytokines. Innocuity assays were performed to measure cell viability of human cord blood mononuclear cells in the presence of diethyl phthalate (DEP), diethylhexyl phthalate (DEHP) and diisononyl phthalate (DINP). Additionally, the effect of these compounds on the expansion of human hematopoietic progenitors was analyzed by clonogenic assays. In innocuity assays it was observed that cultures treated with 10 and 100 µg/ml of DEHP and DINP showed a significant decrease in cell viability. In clonogenic assays was observed that cultures treated with 100 µg/ml of DEHP and DINP showed a significant decrease in colony formation. In contrast, cultures exposed to DEP in both assays did not present significant differences. The phthalates analyzed do exert a negative effect on cell viability, with DEP being less toxic than DEHP and DINP.

**Keywords.** Plasticizers, DEHP, DEP, DINP, endocrine disruptor, toxicity, hematopoietic progenitors.

# 1 INTRODUCCIÓN

Los ésteres de ftalato, también llamados ftalatos, son un grupo de compuestos químicos sintéticos, líquidos, incoloros, viscosos y lipofílicos. Su estructura química es la forma orto del ácido benzenodicarboxílico (ácido 1,2-benzenodicarboxílico (Autian, 1973). Estos compuestos se utilizan como aditivos plastificadores para brindar principalmente flexibilidad al producto plástico terminado o como vehículo para dar color, brillo o fragancia. Los ftalatos como dietil ftalato (DEP), diisononil ftalato (DINP) y dietilhexil ftalato (DEHP), son algunos de los más utilizados y pueden encontrarse en una amplia variedad de productos, como por ejemplo en manteles, tapicería de muebles y automóviles, cortinas de ducha, mangueras, juguetes, revestimiento de alambre y cable, guantes, tubería médica, bolsas de almacenamiento de sangre, cinta adhesiva, cepillos de dientes, envoltura de alimentos, cosméticos, perfumes, aerosoles para el cabello, esmalte de uñas, removedores de esmalte, jabones, detergentes, insecticidas y repelente de mosquitos, adhesivos y lubricantes (ATSDR, 1995, 2002; CPSC, 2010; Latini, 2005; Shaz et al., 2011; Simmchen et al., 2012). Se ha reportado que en algunos casos los ftalatos pueden representar hasta 40% de un producto terminado de uso directo por el consumidor. Específicamente en el área de la salud, se han analizado algunos materiales médicos y se ha encontrado 20-40% de ftalatos en ellos (Kostić et al., 2016; Singh et al., 1972).

Cuando se usan como plastificadores estos aditivos no se unen químicamente a los polímeros del plástico que los contiene y por lo tanto pueden liberarse, migrar y evaporarse al medio que les rodea. Estos contaminantes se han encontrado en

alimentos, aire, suelos, agua y sedimentos. Una vez en el ambiente, son bioacumulados por invertebrados, peces y plantas, pero no se biomagnifican porque animales superiores pueden metabolizarlos y excretarlos, aunque los metabolitos generados son más tóxicos que los compuestos iniciales (Bang et al., 2011; Heudorf y Mersch-sundermann, 2007; Liang et al., 2008; Shaz et al., 2011).

Debido a que los ftalatos se distribuyen con facilidad en el medio ambiente, los humanos están en contacto con ellos mediante diferentes rutas de exposición. Por ejemplo, es muy común la exposición oral, médica, dérmica e inhalación para los ftalatos de alto peso molecular como el DEHP y el DINP. Para el DEP, por ser de bajo peso molecular, las principales rutas de exposición son la dérmica e inhalación, pues es usado principalmente como solvente y vehículo para fragancias e ingredientes para cosméticos, en lugar de como plastificante (Api, 2001; Kavlock et al., 2002; Latini, 2005; Meeker et al., 2009). Lo anterior explica por qué en los humanos los ftalatos se han encontrado en orina, sangre, sudor, leche materna, líquido amniótico, saliva y en la sangre de cordón umbilical (Genuis et al., 2012; Hines et al., 2009; Latini et al., 2003; Main et al., 2006; Tranfo et al., 2014).

Estudios realizados *in vitro* han revelado que los ftalatos modifican la morfología de las células de Sertoli (Gray et al., 1984), dañan la membrana plasmática de células CHO y de eritrocitos de rata (Phillips et al., 1986), reducen la viabilidad de leucocitos humanos (Anderson et al., 1999), provocan apoptosis en células troncales pluripotentes inducidas de células testiculares bovinas y necrosis en células testiculares (Wang et al., 2013), inhiben la proliferación en células WI-38 (Jones et al., 1975), reducen la viabilidad de células U937 induciendo apoptosis (Yokoyama et al., 2003), provocan la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y

muerte celular en macrófagos alveolares de rata (Rakkestad et al., 2010), provocan la secreción de citocinas proinflamatorias en la línea celular de córnea humana B4G12 (Kruger et al., 2012). Estimulan la secreción de citocinas proinflamatorias como IL1- $\beta$  y VEGF en neutrófilos de neonatos mientras que en neutrófilos adultos estimulan la secreción de IL-8 (Vetrano et al., 2010), provocan muerte celular e inducción de TNF- $\alpha$  en citotrofoblastos de cordón umbilical (Benachour y Aris, 2009), alteran la distribución del tipo y velocidad de formación de colonias en progenitores hematopoyéticos CD34+ y aumentan los niveles de apoptosis en células hematopoyéticas troncales CD34+ (Manz et al., 2015).

Es de particular interés conocer qué efecto ejercen los ftalatos sobre la viabilidad celular al interactuar con la sangre de cordón umbilical que es usada como fuente de células troncales. Las células troncales hematopoyéticas extraídas de sangre de cordón umbilical han mostrado ventajas respecto a las células troncales hematopoyéticas de médula ósea o movilizadas de sangre periférica, debido a que no se utilizan técnicas invasivas para obtenerlas y porque exhiben un mayor potencial de proliferación y expansión (Andrade et al., 2013; Cairo y Wagner, 1997). Dado que los ftalatos causan daño y muerte celular y están presentes en bolsas de almacenamiento de sangre es de importancia clínica estudiar el efecto que tienen sobre la población celular total de la sangre de cordón umbilical pues esta se utiliza para trasplantes de células troncales como tratamiento para tumores hematológicos malignos recurrentes, síndromes de falla de médula ósea, estados de inmunodeficiencia congénita severa y algunas alteraciones metabólicas.

## **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato**

Los ensayos de inocuidad de los ftalatos sobre la viabilidad celular de las células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical se realizaron de la siguiente manera. Se recuperaron las células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical mediante un gradiente de Ficoll-paque plus (GE Healthcare) y se resuspendieron en un solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7.2, posteriormente se sembraron 500,000 células/ml en placa de 24 pozos y se cultivaron durante 2 semanas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio IMDM (Sigma) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco), 0.1 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina y 0.25 µg/ml de anfotericina B (Sigma), 5 ng/ml de interleucina-3 (IL-3), 12.5 ng/ml de interleucina-6 (IL-6), 5 ng/ml de factor de células troncales (SCF), 5 ng/ml de ligando del receptor Flt-3 (Flt-3-L) (Peprotech), 10 ng/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (FILATIL), 10 ng/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (GRAMAL) y 3 U/ml de eritropoyetina (Epo) (BIOYETIN) (Probiomed). Durante el cultivo se tomaron muestras cada 24 horas y las células se contabilizaron con Azul de tripano (Sigma). Al día 5 se realizó el recambio de la mitad del medio del cultivo por medio fresco y se añadieron las diferentes concentraciones a analizar (0.1, 1, 10 y 100 µg/ml) de DEP (Sigma), DEHP (Sigma) o DINP (Sigma) en etanol. Los ensayos de inocuidad se realizaron por triplicado para las 4 concentraciones de ftalatos y para los

respectivos controles (medio sin etanol y medio con etanol sin el ftalato). Para DEP y DEHP se realizó réplica biológica.

## **2.2 Ensayos clonogénicos de las cinéticas de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato**

Para explorar el efecto que tienen los ftalatos sobre células hematopoyéticas progenitoras se realizaron ensayos clonogénicos donde se colectaron 10,000 células/ml de los ensayos de inocuidad en los días 0 y 10 y se cultivaron en medio semisólido Methocult (StemCell Technologies) por 14 días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se contabilizaron las diferentes unidades formadoras de colonias (UFC) con base en su morfología. Los ensayos se realizaron por duplicado con réplica biológica para DEP y DEHP.

## **2.3 Análisis estadísticos**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para determinar la probable diferencia de las distintas concentraciones de ftalatos evaluadas con sus respectivos controles. Los experimentos con un valor  $p < 0.05$  son estadísticamente diferentes. Para el análisis estadístico se utilizó el software OriginPro® versión 9.



## 3 RESULTADOS

### 3.1 Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato

En la fig. 1 se muestra la cantidad de células viables por mililitro de los cultivos expuestos desde 0.1 hasta 100  $\mu\text{g/ml}$  de DEP, DEHP y DINP y de los controles en el día 14 de incubación de los ensayos de inocuidad. En la fig. 1A se observa que los cultivos expuestos a 100, 10, 1 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de DEP no presentaron diferencia significativa en la viabilidad celular respecto a los controles. Mientras que en los ensayos con DEHP mostrados en la fig. 1B se observa que los cultivos expuestos a 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  presentaron una reducción significativa en la viabilidad celular del 59.3% y 93.5%, respectivamente. Así mismo, se encontraron diferencias significativas respecto a los controles en la expansión celular en los ensayos expuestos a 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de DINP con una reducción en la viabilidad celular del 32.9% y 87.6%, respectivamente (fig. 1C).

En la fig. 2 se muestran las cinéticas de la expansión de las células mononucleares humanas de los cultivos expuestos a 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de DEP, DEHP y DINP y los controles durante los 14 días de incubación. Para todos los casos los cultivos controles (medio con etanol con ftalato y medio sin etanol) presentaron un comportamiento similar y se mantuvieron sin diferencias significativas. En la fig. 2A se muestra una cinética representativa de la expansión celular de los cultivos expuestos a DEP (0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ ) y los controles. Se observó que para los 6 tratamientos la fase lag fue de 6 días. Los controles y los cultivos tratados con 0.1, 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  presentaron una expansión similar y se mantuvieron sin diferencias

significativas; en el día 7 entraron a la fase exponencial; en el día 13 presentaron la fase de meseta; y finalmente se observó un decremento en la pendiente al día 15. Por otro lado, en los cultivos tratados con 100 µg/ml se observó una disminución en la velocidad de crecimiento ya que entraron a la fase exponencial hasta el día 9 y pasaron a la fase de meseta el día 14; no obstante, se observó una disminución significativa en la viabilidad celular respecto a los controles a partir del día 8. En la fig. 2B se muestra una cinética representativa de la expansión celular de los cultivos expuestos desde 0.1 hasta 100 µg/ml de DEHP y los cultivos controles. Se encontró que para los 6 tratamientos la fase lag fue de 4 días. Los controles presentaron la fase exponencial al día 5, la fase estacionaria al día 9 y en el día 12 la fase de decaimiento. En los cultivos expuestos a 0.1 µg/ml la fase exponencial se presentó en el día 5, a partir del día 10 la pendiente comenzó a disminuir observándose una diferencia significativa sobre la viabilidad celular al día 12. Los cultivos tratados con 1 y 10 µg/ml presentaron un comportamiento semejante; entraron a la fase exponencial el día 5; a la fase de meseta el día 9; y a la fase de decaimiento el día 11. Se observó una diferencia significativa sobre la viabilidad celular respecto a los controles a partir de los días 9 y 8, respectivamente. En los cultivos expuestos con 100 µg/ml se observó una disminución significativa en la viabilidad celular a partir del día 7. En la fig. 2C se muestra una cinética representativa de la expansión celular de los cultivos expuestos a DINP a 0.1, 1, 10 y 100 µg/ml y los respectivos controles. En este caso se observó que para los 6 tratamientos la fase lag fue de 6 días. Los controles y los cultivos expuestos a 0.1 y 1 µg/ml presentaron un comportamiento similar y se mantuvieron sin diferencias significativas. La fase exponencial la presentaron en el día 7; la fase de meseta en el día 13; y finalmente se observó una

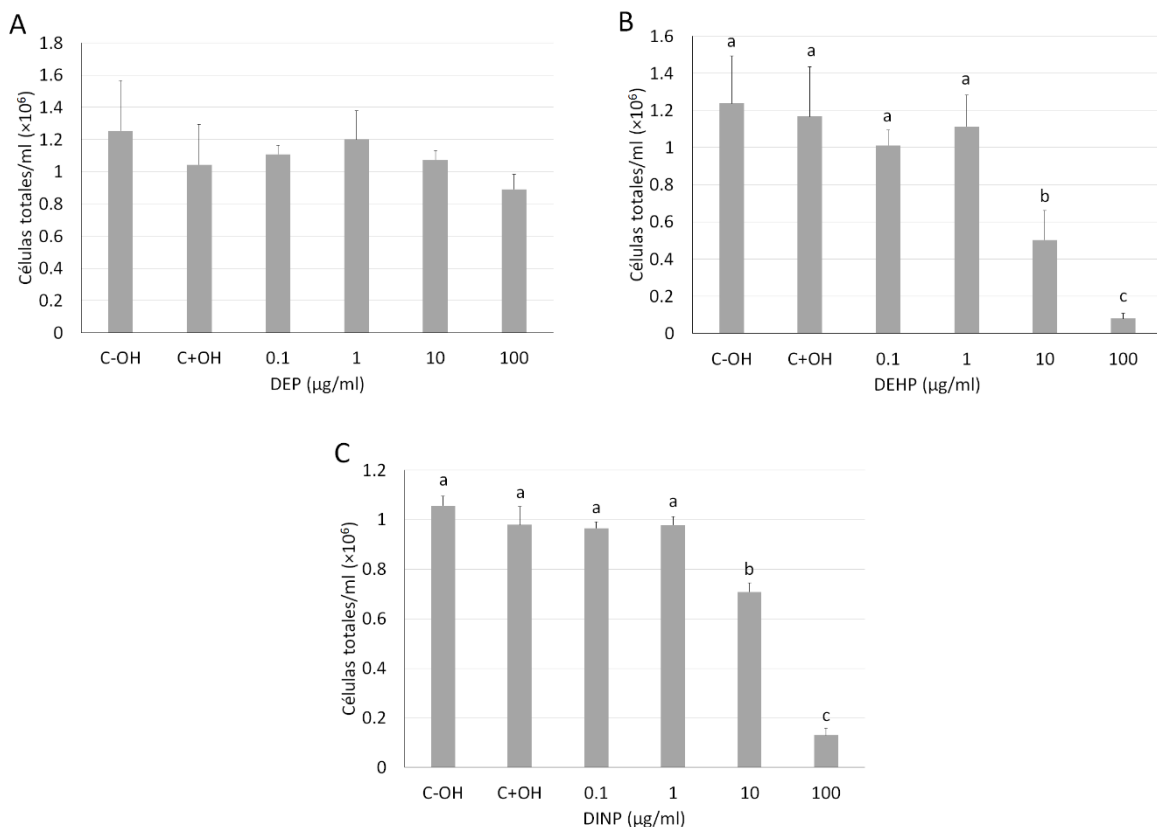
disminución en la pendiente al día 15. Por otro lado, en los cultivos tratados con 10  $\mu\text{g/ml}$  se observó una disminución significativa respecto a los controles en la viabilidad celular a partir del día 9, la fase exponencial la presentaron al día 7 mientras que la fase de meseta entre los días 12 y 15. En los cultivos tratados con 100  $\mu\text{g/ml}$  se observó una disminución significativa en la viabilidad celular a partir del día 8.

En la fig. 3 se observa el daño causado a la morfología celular por la exposición a ftalatos al final del ensayo de inocuidad. En las filas se muestra el efecto de la concentración del ftalato en la morfología celular de los cultivos tratados con 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  y los controles (medio con etanol sin ftalato y medio sin etanol), respectivamente. En las columnas se muestra el efecto del ftalato utilizado, DEP, DEHP y DINP, respectivamente. En las fig. 4A, 4D, 4G, 4J, 4M y 4O se muestra la morfología celular de cultivos tratados con 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de DEP y los controles, respectivamente. No se observó una disminución evidente en la cantidad y el tamaño celular en los cultivos tratados desde 0.1 hasta 100  $\mu\text{g/ml}$  comparados con los controles. Sin embargo, a 100  $\mu\text{g/ml}$  pocas células presentaron un cambio leve en su morfología. En las fig. 4B, 4E, 4H, 4K, 4N y 4P se muestra la morfología celular de cultivos tratados con 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de DEHP y los controles, respectivamente y en las fig. 4C, 4F, 4I, 4L, 4Ñ y 4Q se muestra la morfología celular de cultivos tratados con 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de DINP y los controles, respectivamente. Los cultivos tratados con DEHP y DINP a 0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$  no presentaron un cambio aparente en la cantidad y la morfología celular respecto a los controles. En cambio, los cultivos tratados con 10  $\mu\text{g/ml}$  de DEHP y de DINP presentaron una disminución visible en la cantidad de células y un cambio leve en

la morfología celular. Los cultivos tratados con 100 µg/ml de DEHP y de DINP presentaron una disminución considerable en la cantidad de células, así como cambios en la morfología celular.

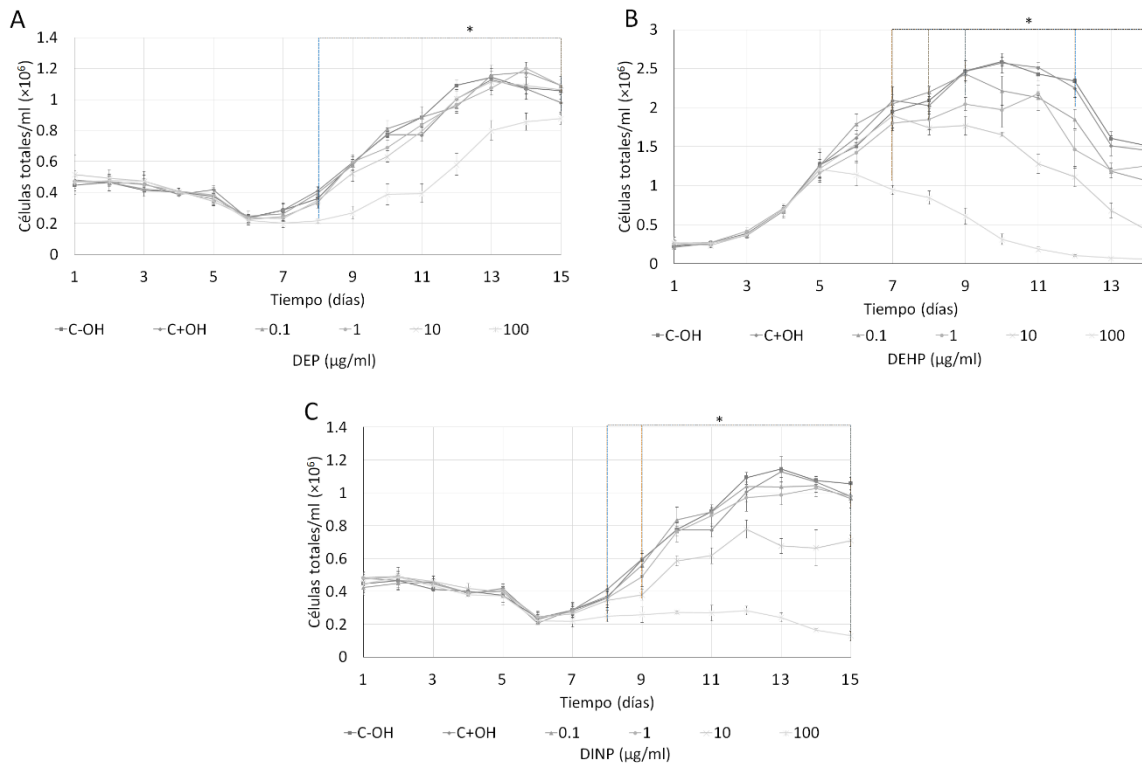
### **3.2 Ensayos clonogénicos de las cinéticas de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato**

En la fig. 4 se muestra las unidades formadoras de colonias (UFCs) presentes en el día 10 del ensayo de inocuidad expuestas a concentraciones desde 0.1 hasta 100 µg/ml de DEP, DEHP y DINP y los controles. En la fig. 4B y 4C se muestran las UFCs presentes al día 10 del ensayo de inocuidad de los cultivos expuestos desde 0.1 hasta 100 µg/ml de DEHP y DINP, respectivamente y de los cultivos controles. Se observó que a 100 µg/ml de DEHP y de DINP hubo una disminución significativa de los progenitores hematopoyéticos del 81% y del 41% respectivamente en comparación con los controles. Esto indica que tanto DEHP como DINP afectan negativamente la expansión de progenitores hematopoyéticos. Por el contrario, en la fig. 4A se muestran las UFCs presentes al día 10 del ensayo de inocuidad de los cultivos expuestos a desde 0.1 hasta 100 µg/ml de DEP. No se observó disminución significativa en los ensayos clonogénicos con células que fueron tratadas con DEP en concentraciones de 0.1 a 100 µg/ml respecto a las células de los cultivos controles.



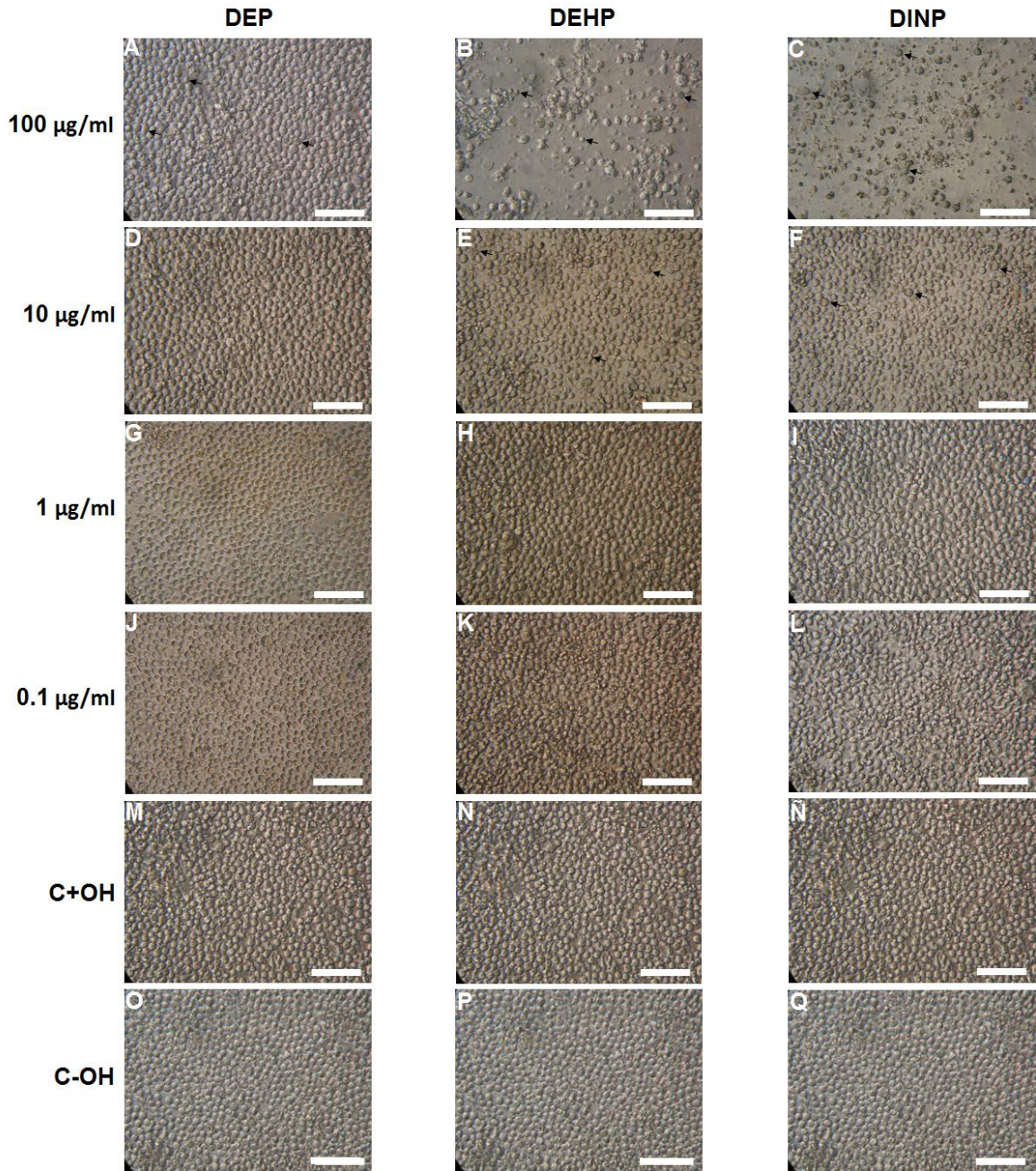
**Fig. 1. Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisonoil ftalato al día 14 de incubación**

Las gráficas muestran el número de células viables al final de los ensayos de inocuidad de los cultivos controles y los expuestos a 0.1, 1, 10 y 100 µg/ml de DEP, DEHP y DINP, respectivamente. Los cultivos se iniciaron con 500,000 células/ml. C-OH (control sin etanol) y C+OH (control con etanol sin ftalato). El ensayo se realizó por triplicado para los cultivos expuestos a las 4 diferentes concentraciones a analizar de ftalato y para los cultivos controles. Se realizó réplica biológica para DEP y DEHP. (A) Cultivos expuestos a DEP. El análisis estadístico arrojó que los cultivos expuestos a DEP desde 0.1 hasta 100 µg/ml se mantuvieron sin diferencias significativas respecto a los controles. (B) Cultivos expuestos a DEHP. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas en los cultivos tratados con DEHP a 10 y 100 µg/ml respecto a los cultivos controles. (C) Cultivos expuestos a DINP. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas en los cultivos tratados con DINP a 10 y 100 µg/ml respecto a los cultivos controles.



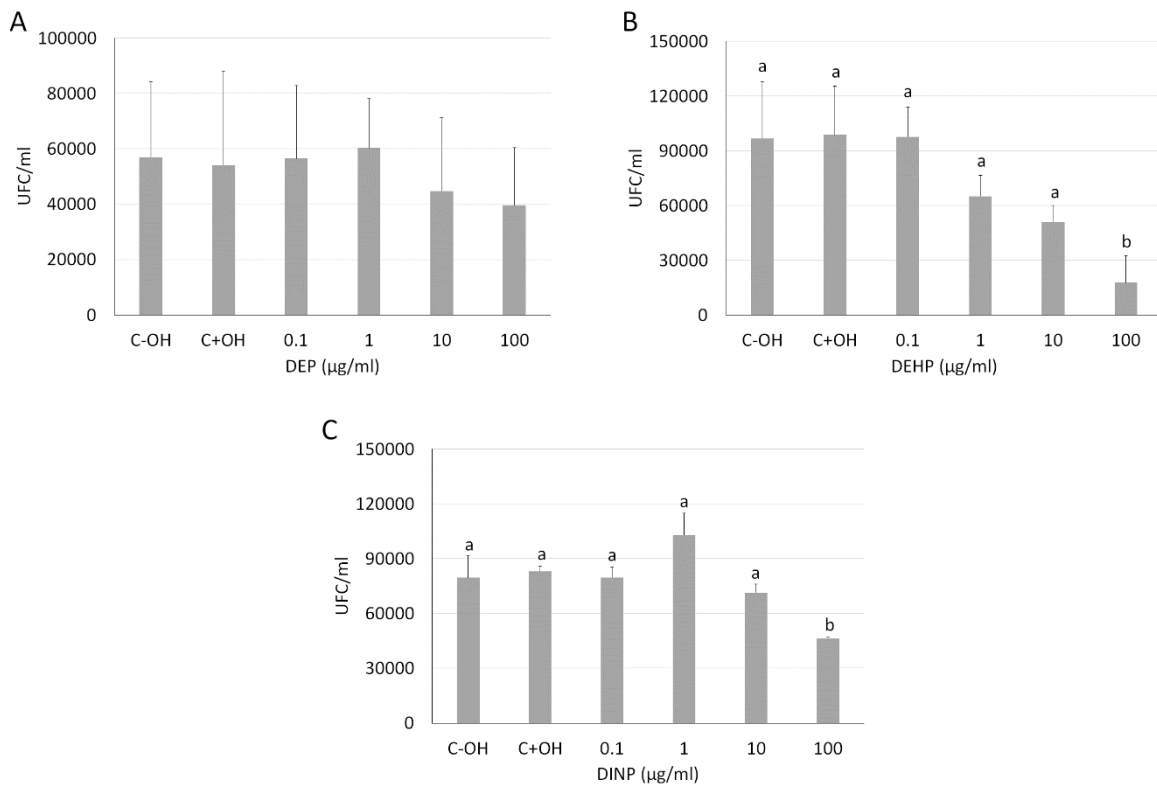
**Fig. 2. Cinética de los ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato**

Las gráficas muestran las curvas de expansión celular total durante el periodo de incubación de las células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical expuestas desde 0.1 hasta 100  $\mu\text{g/ml}$  de DEP, DEHP y DINP y los respectivos cultivos controles. Los ensayos se iniciaron con 500,000 células/ml. C-OH (control sin etanol) y C+OH (control con etanol sin ftalato). El ensayo se realizó por triplicado para los cultivos expuestos a las 4 diferentes concentraciones a analizar de ftalato y para los cultivos controles. Se realizó réplica biológica para DEP y DEHP. (A) Cultivos tratados con DEP. El análisis estadístico arrojó que los únicos cultivos que presentaron diferencia significativa respecto a los controles fueron los cultivos expuestos a 100  $\mu\text{g/ml}$  en el día 8. (B) Cultivos tratados con DEHP. El análisis estadístico arrojó que, respecto a los cultivos controles, al día 7 los cultivos expuestos a 100  $\mu\text{g/ml}$  presentaron diferencias significativas, al día 8 y 9 los cultivos expuestos a 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente y al día 12 los cultivos expuestos a 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . (C) Cultivos tratados con DINP. El análisis estadístico arrojó que, respecto a los cultivos controles, al día 8 los cultivos expuestos a 100  $\mu\text{g/ml}$  y al día 9 los cultivos expuestos a 10  $\mu\text{g/ml}$  presentaron diferencias significativas. En cambio, los cultivos expuestos a 0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$  no presentaron diferencias significativas. Los cultivos controles se mantuvieron sin diferencias significativas.



**Fig. 3. Células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical en el día 14 de cultivo de los ensayos de inocuidad**

Se muestran las células de los cultivos de células mononucleares humanas expuestas desde 0.1 hasta 100 µg/ml de DEP, DEHP y DINP y los cultivos controles al día 14 de incubación. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de contraste de fases invertido a una ampliación de 40X. La barra de escala corresponde a 100 µm. Las flechas negras presentes en las imágenes de los cultivos expuestos a 100 µg/ml de DEP, DEHP y DINP y 10 µg/ml de DEHP y DINP indican células con posibles daños por la exposición a los ftalatos.



**Fig. 4. Ensayos clonogénicos de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato**

Las gráficas muestran el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de los cultivos expuestos a DEP, DEHP y DINP en concentraciones de 0.1 a 100 µg/ml y las de los cultivos controles en el día 10 de los ensayos de inocuidad. Los cultivos se iniciaron con 10,000 células/ml. C-OH (control sin etanol) y C+OH (control con etanol sin ftalato). El ensayo se realizó por duplicado para los cultivos expuestos a las 4 diferentes concentraciones de ftalatos y para los cultivos controles. Se realizó réplica biológica para el DEP y DEHP. (A) Cultivos expuestos al DEP. El análisis estadístico no arrojó ninguna diferencia significativa entre los tratamientos y controles. (B) Cultivos expuestos al DEHP. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas en la cantidad de las UFCs expuestas a 100 µg/ml respecto a los controles. (C) Cultivos expuestos a DINP. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas en la cantidad de las UFCs expuestas 100 µg/ml respecto a los controles.



## 4 DISCUSIÓN

### 4.1 Ensayos de inocuidad de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato

Nuestros resultados sobre el daño celular concuerdan con otros trabajos donde se reporta el daño celular causado por estos compuestos. Por ejemplo, se ha reportado que los ftalatos inducen apoptosis en espermatozoides (Bhattacharya et al., 2005). En citotrofoblastos provocan apoptosis y necrosis celular debido al incremento en la producción del TNF- $\alpha$  (Benachour y Aris, 2009). En la línea celular endotelial de córnea humana B4G12 los ftalatos inducen la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Kruger et al., 2012), usadas como marcadores de daño celular. En células mononucleares el DEHP estimula la liberación de IL-1 (Vetrano et al., 2010). Estos resultados indican un daño directo a las células que liberan citocinas mediadoras de la respuesta de inflamación en muchos tejidos.

Un estudio previo reportó que las células hematopoyéticas progenitoras troncales contienen los receptores de hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, prolactina, andrógenos, estrógeno  $\beta$  y progesterona capaces de estimular la hematopoyesis (Mierzejewska et al., 2015). Por lo tanto, los ftalatos pudieran estar ejerciendo su acción por medio de estos receptores nucleares. Además, se sabe que los ftalatos pueden interactuar o modificar la expresión de algunos receptores nucleares tales como los receptores de estrógenos, andrógenos, aril-hidrocarburo, proliferadores de peroxisomas y de ácido retinoico (Bhattacharya et al., 2005; Harris et al., 1997; Hong et al., 2005; Mankidy et al., 2013; Takeuchi et al., 2005).

El cambio en la morfología celular ha sido observado en otros estudios enfocados a los ftalatos, por ejemplo, cambios en la morfología en las células de Sertoli (Gray et al., 1984) y daño a la membrana celular de la línea celular CHO y de eritrocitos de rata (Phillips et al., 1986).

En la figura 2B se puede observar que los cultivos tratados con DEHP a 0.1 µg/ml mostraron una diferencia significativa al día 12 cuando los cultivos controles ya estaban en fase de decaimiento. Esta diferencia pudo deberse al declive de la pendiente por la generación de sustancias que inhiben el crecimiento celular y por la disminución de sustratos como glucosa y glutamina indispensables para la supervivencia celular. Lo anterior ha sido observado en un estudio que analizó el efecto del amonio y el lactato sobre la línea celular CHO. Encontraron que el amonio generado a partir del metabolismo de la glutamina y el lactato generado por el consumo de la glucosa disminuyen la proliferación celular (Slivac et al., 2010).

Estudios enfocados en la liberación de ftalatos hacia la sangre y sus derivados cuando son almacenados en contenedores plásticos han reportado que las bolsas de almacenamiento de plasma liberan  $57 \pm 20$  µg/ml de DEHP después de 24 horas de almacenaje, mientras que, en eritrocitos almacenados la concentración de DEHP aumentó de  $4.1 \pm 0.9$  µg/ml al día 1 a  $33 \pm 11$  µg/ml al día 42 de almacenamiento (Lagerberg et al., 2015). Por lo tanto, conforme avanza el tiempo de almacenaje la concentración de DEHP también aumenta. En sangre total almacenada por 21 días se encontró hasta 83.2 µg/ml de DEHP (Inoue et al., 2005). En sangre de cordón se encontró hasta  $17.8 \pm 2.7$  µg/ml de DEHP en las primeras 24 horas de almacenaje (Yamaguchi et al., 2014). Por otro lado, se determinó que la velocidad de liberación del DEHP desde las bolsas plásticas de almacenamiento hacia la sangre es de

0.0025 ± 0.0003 mg/ml/día a 4°C (Jaeger y Rubin, 1972). Las concentraciones de DEHP encontradas en sangre almacenada se deben a que los materiales plásticos utilizados en el área médica contienen cantidades elevadas de este aditivo plastificador. Por ejemplo, en bolsas y tubos para diálisis se ha reportado que el DEHP representa el 31-34% del producto (Kostić et al., 2016).

#### **4.1 Ensayos clonogénicos de dietil ftalato, dietilhexil ftalato y diisononil ftalato**

El efecto negativo de los ftalatos sobre los progenitores hematopoyéticos se ha observado en cultivos iniciados con células CD34+ en presencia de DEHP por 72 h, donde se reportó una reducción significativa (57.4%) en la cantidad de colonias formadas respecto al control (Manz et al., 2015). En otro estudio Ortiz-Rodríguez (2016) encontró que tanto dibutil ftalato (DBP) como benzil butil ftalato (BBP) afectan la viabilidad y la morfología de las células mononucleares humanas expuestas a concentraciones de 100 µg/ml así como a la expansión de los progenitores hematopoyéticos. Estas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos en este trabajo para DEHP y DINP.

## **5 CONCLUSIONES**

El DEHP y el DINP son más tóxicos que el DEP y el efecto tóxico del DEHP y el DINP sobre la viabilidad celular es concentración-dependiente. La exposición a 100 µg/ml de DEHP o DINP reduce la expansión de los progenitores hematopoyéticos.

## 6 PERSPECTIVAS

- Medir la concentración de ftalatos en muestras de plasma del cordón umbilical de neonatos mexicanos para conocer la concentración inicial a la cual están expuestas las muestras.
- Cuantificar el contenido de ftalatos en las bolsas de almacenamiento de sangre de cordón umbilical y materiales de laboratorio para determinar el porcentaje de ftalatos presentes.
- Medir en el pellet celular la expresión de transcritos de citocinas proinflamatorias y receptores involucrados en la muerte celular para elucidar el mecanismo de acción de los ftalatos.
- Correlacionar la expresión de transcritos de receptores y citocinas con las proteínas respectivas para verificar la producción de las proteínas y su localización celular.
- Cuantificar ftalatos, glucosa, glutamina, lactato y amonio en el medio de cultivo para confirmar si la disminución en la pendiente al final del periodo de incubación correlaciona con la disminución de nutrientes esenciales y la generación de compuestos tóxicos.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2002. "Toxicological Profile for Di (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP)." Available Online Via: [www.atsdr.cdc.gov/](http://www.atsdr.cdc.gov/).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995. "Toxicological Profile for Diethyl Phthalate (DEP)." Available Online Via: [www.atsdr.cdc.gov/](http://www.atsdr.cdc.gov/).
- Anderson, D., Yu T.W. and Hinc F. 1999. "Effect of Some Phthalate Esters in Human Cells in the Comet Assay." *Teratog Carcinog Mutagen*,19:275-280.
- Andrade P.Z., Santos F., Cabral J.M.S. Silva C.L. 2013. "Stem Cell Bioengineering Strategies to Widen the Therapeutic Applications of Haematopoietic Stem/Progenitor Cells from Umbilical Cord Blood." *J Tissue Eng Regen Med*. DOI: 10.1002/term.1741
- Api A. M. 2001. "Toxicological profile of Diethyl Phthalate: A Vehicle for Fragrance and Cosmetic Ingredients." *Food Chem Toxicol*. 39:97-108.
- Autian, J. 1973. "Toxicity and Health Threats of Phthalate Esters: Review of the Literature." *Environ Health Persp* 4(June):3–26.
- Bang D. Y., Lee I. K. and Lee B. M. 2011. "Toxicological Characterization of Phthalic Acid." *Toxicol Res*. 27(4):191–203.
- Benachour N. and Aris A. 2009. "Toxic Effects of Low Doses of Bisphenol-A on Human Placental Cells." *Toxicol Appl Pharmacol*. 241(3):322–328.
- Bhattacharya, N., Dufour J. M., Vo M. N., Okita J., Okita R., and Kim K. H. 2005. "Differential Effects of Phthalates on the Testis and the Liver." *Biol Reprod*. 72(3):745–54.
- Cairo M. S. and Wagner J. E. 1997. "Placental And/or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation." *Blood*. 90(3):837–845.
- Cosumer Product Safety Commission. 2010. "Toxicity Review of Diisononyl Phthalate (DINP)". Available Online Via: [www.cpsc.gov/](http://www.cpsc.gov/).
- Genuis S. J., Beeson S., Lobo R. A. and Birkholz D. 2012. "Human Elimination of Phthalate Compound: Blood, Urine, and Sweat (BUS) Study." *Sci World J*. doi:10.1100/2012/615068.
- Gray, T. J. B., Beamand J. A. and Road W. 1984. "Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells." *Fd Chem Toxic*. 22(2):123-131.
- Harris C A., Henttu P., Parker M. G. and Sumpter J. P. 1997. "The Estrogenic Activity of Phthalate Esters in Vitro." *Environl Health Perspec*. 105(8):802–811.
- Hays S. M., Aylward L.L., Kirman C. R., Krishnan K. and Nong A. 2011. "Biomonitoring Equivalents for Di-Isononyl Phthalate (DINP)." *Regul Toxicol Pharmacol*. 60:181–188.
- Heudorf U., Mersch-sundermann V. and Angerer J. 2007. "Phthalates: Toxicology and Exposure." *Int J Hyg Environ Health*. 210:623–634.
- Hines E. P., Calafat A. M., Silva M. J., Mendola P. and Fenton S. E. 2009. "Concentrations of Phthalate Metabolites in Milk, Urine, Saliva, and Serum of Lactating North Carolina Women." *Rev Environ Health*. 117(1):86–92.

- Hong E. J., Ji Y. K., Choi K. C., Manabe N. and Jeung E. B. 2005. "Conflict of Estrogenic Activity by Various Phthalates between in Vitro and in Vivo Models Related to the Expression of Calbindin-D9k." *J Reprod Dev.* 51(2):253–263.
- Inoue K., Kawaguchia M., Yamanakab R., Higuchia T., Itoa R., Saitoa K. and Nakazawaa H. 2005. "Evaluation and Analysis of Exposure Levels of di(2-Ethylhexyl) Phthalate from Blood Bags." *Clin Chim Acta.* 358(1–2):159–166.
- Jaeger R. and Rubin R. 1972. "Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues" *N Engl J Med.* 287(22):1114-1118.
- Jones A. E., Kahn R. H., Groves J. T. and Napier E. A. 1975. "Phthalate Ester Toxicity in Human Cell." *Toxicol Appl Pharmacol.* 31:283–289.
- Kavlock R., Boekelheide K., Chapin R., Cunningham M., Faustman E., Foster P., Golub M., Henderson R., Hinberg I., Little R., Seed J., Shea K., Tabacova S., Tyl R., Williams P and Zacharewski T. 2002. "NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: Phthalates Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of di(2-Ethylhexyl) phthalate." *Reprod Toxicol.* 16:529-563.
- Kostić I. S., Anđelković T. D., Anđelković D.H., Cvetković T. P., and Pavlović D. D. 2016. "Determination of Di ( 2-Ethylhexyl ) Phthalate in Plastic Medical Devices." *Hem Ind.* 70(2):159–164.
- Kruger T., Cao Y., Kjaergaard S. K., Knudsen L. E. and Bonefeld-Jorgensen E. C. 2012. "Effects of Phthalates on the Human Corneal Endothelial Cell Line B4G12." *Intl J toxicol.* 31(4):364–371.
- Lagerberg J. W., Gouwerok E., Vlaar R., Go M. and De Korte D. 2015. "In Vitro Evaluation of the Quality of Blood Products Collected and Stored in Systems Completely Free of di (2-Ethylhexyl) phthalate–plasticized Materials." *Transfus Med Rev.* 55(March):522–531.
- Latini G., De Felice C., Presta G., Del Vecchio A., Paris I., Ruggier F. and Mazzeo P. 2003. "In Utero Exposure to Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate and Duration of Human Pregnancy." *Environ Health Perspect.* 111(14):1783–1785.
- Latini G. 2005. "Monitoring Phthalate Exposure in Humans." *Clin Chem Acta.* 361:20–29.
- Liang D. W., Zhang T., Fang H. H. P. and He J. 2008. "Phthalates Biodegradation in the Environment." *Appl Microbiol Biotechnol.* 80:183–198.
- Main, K.M., Mortensen G.K., Kaleva M.M., Boisen K.A., Damgaard I.N., Chellakooty M., Schmidt I.M, Suomi A. M., Viertanene H.E., Petersen J.H., Andersson A.M., Toppari J. and Skakkebaek N.E. 2006. "Human Breast Milk Contamination with Phthalates and Alterations of Endogenous Reproductive Hormones in Infants Three Months of Age." *Environ Health Perspect.* 114(2):270–276.
- Mankidy R., Wiseman S., Ma H. and Giesy J. P. 2013. "Biological Impact of Phthalates." *Toxicol Lett.* 217(1):50–58.
- Manz P., Wilk C. M. and Fischer J. C. 2015. "Influence of Di (2-ethylhexyl) phthalate on migration rate and differentiation of human hematopoietic stem and progenitor cells (CD34+)" *Clin Hemorheol Microcirc.* 61:111-118.

- Meeker J. D., Sathyanarayana S. and Swan S. H. 2009. "Phthalates and Other Additives in Plastics: Human Exposure and Associated Health Outcomes." *Phil Trans R Soc B* 364:2097–2113.
- Ortiz-Rodríguez, A. (2016). Efecto de los ftalatos sobre la expansión in vitro de las células hematopoyéticas humanas (tesis de maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí.
- Phillips B. J., Anderson D. and Gangolli S. D. 1986. "Studies on the Genetic Effects of Phthalic Acid Esters on Cells in Culture." *Environ Health Perspect.* 65(11):263–266.
- Rakkestad K. E., Holme J. A., Paulsen R. E., Schwarze P. E. and Becher R. 2010. "Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces both pro- And Anti-Inflammatory Responses in Rat Alveolar Macrophages through Crosstalk between p38 , the Lipoxygenase Pathway and PPAR $\alpha$ " *inhal toxicol.* 22(2):140-150.
- Shaz B. H., Grima K. and Hillyer C. D. 2011. "2-(Diethylhexyl) phthalate in Blood Bags: Is This a Public Health Issue?" *Transfus Med Rev.* 51:2510–2517.
- Simmchen J., Ventura R. and Segura J. 2012. "Progress in the Removal of Di-[2-Ethylhexyl]-Phthalate as Plasticizer in Blood Bags." *Transfus Med Rev.* 26(1):27–37.
- Singh A. R., Lawrence W. H. and Autian J. 1972. "Teratogenicity of Phthalate Esters in Rats." *J Pharm Sci.* 61(1):51–55.
- Slivac I., Blajic V., Radosevic K., Kniewald Z and, Srcek V. G. 2010. "Influence of Different Ammonium, Lactate and Glutamine Concentrations on CCO Cell Growth." *Cytotechnology.* 62:585–594.
- Takeuchi S., Iida M., Kobayashia S., Jin K., Matsudac T. and Kojima H. 2005. "Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and androgen receptor." *Toxicology.* 210:223–233.
- Tranfo G., Paci E., Pignini D., Bonanni R. S., Capanna S., De Carolis C. and Lavicoli S. 2014. "Phthalate Metabolites in Amniotic Fluid and Maternal Urine Samples." *J Environ Prot.* 5:1411–1418.
- Vetrano A. M., Laskin D. L., Archer F., Syed K., Gray J. P., Laskin J. D., Nwebube N. and Weinberger B. 2010. "Inflammatory Effects of Phthalates in Neonatal Neutrophils." *Pediatr res.* 68(2):134–139.
- Wang S. W., Wang S. W., Wu D. C., Lin Y. C., Ku C. C., Wu C. C., Chai C. Y., Lee J. N., Tsai E. M., Lin C. L., Yang R. C., Ko Y. C., Yu H. S., Huo C., Chuu C. P., Murayama Y., Nakamura Y., Hashimoto S., Matsushima K, Jin C., Eckner R., Lin C. S., Saito S. and Yokoyama K. K. 2013. "Androgen Receptor-Mediated Apoptosis in Bovine Testicular Induced Pluripotent Stem Cells in Response to Phthalate Esters." *Cell Death Dis.* doi:10.1038/cddis.2013.420
- Yamaguchi, R., Takanashi, M., Ito M., Ogawa A., Hashimoto M., Ishii Y., Mazda T., Tadokoro K., Nakajima K. and Minami M. 2014. "Plasticizer Concentration in Cord Blood Cryopreserved with DMSO." *Bone marrow transplant.* 49(1):157–158.
- Yokoyama Y., Okubo T., Kano I. and Sato S. 2003. "Induction of Apoptosis by Mono (2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP) in U937 Cells." *Toxicol lett.* 144:371–381.