



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Cytotoxic effects and changes in genetic
expression on human vascular
endothelial cells by DINP and DEHT**

Tesis que presenta

Daniel Alberto Torres García

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2025



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Cytotoxic effects and changes in genetic expression on human vascular endothelial cells by DINP and DEHT**" presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Daniel Alberto Torres García** y aprobada el **18 de junio del 2025** 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 María Estrada Sánchez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial

Dra. María del Carmen González Castillo
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 861585 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue realizada en el Laboratorio de Microscopía del Instituto de Ciencia y Tecnología (IPICYT), con el apoyo técnico de la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano. Agradecemos especialmente al Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LINAN) por el acceso a sus instalaciones, equipo especializado y asesoría técnica, indispensables para la obtención y análisis de las micrografías electrónicas presentadas en este estudio.

Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo, ante todo, a mi familia.

A mi papá, Francisco Torres, porque sin su apoyo y esfuerzo, la conclusión de este proyecto no habría sido posible. Gracias por enseñarme a nunca rendirme.

A mis tías, Irma Torres y Eloísa Torres, que siempre han estado ahí, empujándome con su cariño, con su fe en mí, y recordándome que los sueños sí se alcanzan con dedicación.

Y especialmente, a mi abuela, Regina Ortega. Porque sin ella, nada de esto habría sido posible. Ha sido mi guía, mi pilar y mi mayor inspiración desde los primeros años de escuela hasta este momento que marca el cierre de una etapa tan importante. Su amor, su fuerza y su ejemplo me han sostenido siempre.

También quiero dedicárselo al resto de mi familia mis primos Ana Paula, Luis, e Iker, mis tíos Rodolfo y Fernando que en cada paso me han mostrado su apoyo incondicional.

Este logro no es solo mío: es de todos ustedes.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Antonio De León Rodríguez por haberme recibido en su laboratorio, por su paciencia y por todo lo que me enseñó a lo largo de este proceso. Su guía y compromiso tuvieron un impacto fundamental en mi formación académica, y me siento profundamente agradecido por la oportunidad de haber formado parte de su laboratorio

Agradezco al Dr. Víctor E. Balderas Hernández por el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo. Gracias por quebrarse la cabeza conmigo cada que un experimento no resultaba como quería, por su ayuda incondicional en los momentos difíciles por no perder la confianza y fe en mí, incluso cuando yo mismo dudaba. Muchas gracias por tu amistad que llevare conmigo siempre y ha dejado huella en mi vida.

Agradezco profundamente a mi comité tutorial la Dra. Ana María Estrada, la Dra. Carmen González y el Dr. Juan Francisco Jiménez por el respaldo académico brindado a lo largo de estos años. Sus observaciones siempre encaminadas a perfeccionar este trabajo y sus oportunos consejos han sido fundamentales para mi formación y para la calidad de esta investigación.

Gracias a la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano por su paciencia apoyo y conocimiento en los experimentos de microscopia electrónica.

Agradezco al CONACYT, ahora Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, por la beca 861585 que hizo posible mis estudios de doctorado. También al IPICYT, a los profesores de la División de Biología Molecular y al personal de apoyo, por brindarme un entorno que favoreció mi formación y desarrollo como científico.

Quiero agradecer a Ricardo y Alejandra, por ser mis compañeros de casa y de vida. Gracias por estar siempre ahí, por su apoyo incondicional y por todos los buenos momentos que compartimos juntos; nuestra casa fue siempre un refugio para seguir adelante.

Agradezco con cariño a todos mis amigos y compañeros del Laboratorio 4, por su compañía, por las risas, el ánimo constante y los momentos que hicieron más llevadero el trabajo diario. JJ, Mariela, Iván, Anel, Betssie, y Sara. gracias por hacerlo todo más llevadero. Gracias a Cecy y Marco llevo su amistad conmigo siempre y los extraño y especialmente agradezco a Karen Pirru, por haberme enseñado tantas cosas, sin tu conocimiento no hubiera sido posible este logro. Resulta que al final “you are [not] on your own, kid”.

A mis demás amigos, que han estado a mi lado en los días difíciles y también en los más felices: Miguel, Sara De Anda, Misael, Lalo, Ulises, Paco e Iñaki, gracias por su amistad, su cariño y por ayudarme a mantener el equilibrio en este largo camino.

Y, por supuesto, agradezco profundamente a mi familia, cuyo apoyo constante ha sido la base sobre la que he podido construir cada uno de mis logros. Su amor ha sido siempre mi mayor fuerza.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x

Introducción General	1
Objetivos	5
Capítulo 1	6
Capítulo 2	8
Introducción	8
Métodos	9
Resultados	10
Discusión	12
Conclusión	13
Referencias	14

Lista de figuras

1. Micrografías representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células EA.hy926 expuestas a DINP (fila central) y DEHT (fila inferior) a una concentración de 100 µg/mL, en comparación con las células control (fila superior).

10

Resumen

Efectos citotóxicos y cambios en la expresión genética en células endoteliales vasculares humanas inducidos por DINP y DEHT.

Los ftalatos son plastificantes ampliamente utilizados para mejorar la flexibilidad de polímeros rígidos como el policloruro de vinilo (PVC); sin embargo, han generado preocupación debido a su potencial citotóxico y su capacidad para alterar el sistema endocrino. En esta tesis, se estudió el impacto biológico del ftalato de diisononilo (DINP) y del tereftalato de di(2-etilhexilo) (DEHT) sobre células endoteliales vasculares humanas (EA.hy926), con un enfoque en los cambios en la viabilidad celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante (NFE2L2, SOD1, TXN y TXNRD2), tras la exposición a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL. La viabilidad celular se evaluó mediante los ensayos de MTT y liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), mientras que la producción de ROS se midió utilizando el método con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA). La expresión génica se analizó mediante qRT-PCR después de 48 h de exposición. La exposición a 100 µg/mL de DINP provocó una disminución notable en la viabilidad celular del 11% a las 48 h y del 17% a las 72 h, además de un incremento del 69% en la liberación de LDH a las 48 h. Asimismo, se observó un aumento en los niveles de ROS del 19 al 30%, acompañado de una disminución en la expresión de los genes NFE2L2, TXN y TXNRD2. En contraste, el tratamiento con DEHT no afectó la viabilidad celular ni incrementó los niveles de LDH, aunque sí produjo un aumento moderado en la producción de ROS (11–14%) y una mayor expresión en los genes antioxidantes, incluyendo SOD1. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se empleó para examinar características ultraestructurales en células EA.hy926 tratadas con 100 µg/mL de cada compuesto durante 48 h. Bajo estas condiciones experimentales, no se observaron alteraciones morfológicas significativas ni daños subcelulares. Estos hallazgos indican que la exposición a DINP afecta negativamente la respuesta celular al estrés oxidativo y redujo la expresión de genes antioxidantes, mientras que la exposición a DEHT, por el contrario induce vías antioxidantes sin afectar la viabilidad celular.

PALABRAS CLAVE. Especies reactivas de oxígeno, respuesta antioxidante, estrés oxidativo, plastificantes, disruptores endocrinos.

Abstract

Cytotoxic effects and changes in genetic expression on human vascular endothelial cells by DINP and DEHT

Phthalates are widely used plasticizers that enhance the flexibility of rigid polymers such as polyvinyl chloride (PVC), but they have raised concern due to their cytotoxic and endocrine-disrupting potential. This study explored the biological impact of Diisononyl phthalate (DINP) and Di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT) on human vascular endothelial cells (EA.hy926), focusing on changes in cell viability, reactive oxygen species (ROS) generation, and expression of antioxidant-related genes (NFE2L2, SOD1, TXN, and TXNRD2) following exposure to concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL.

Cell viability was assessed using MTT and lactate dehydrogenase (LDH) release assays, while ROS production was measured using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) method. Gene expression levels were analyzed via quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) after 48 hours of exposure.

Exposure to 100 µg/mL of DINP resulted in a notable decline in cell viability—11% at 48 hours and 17% at 72 hours—as well as a 69% increase in LDH release at 48 hours. Additionally, ROS levels rose by 19–30%, accompanied by a downregulation of NFE2L2, TXN, and TXNRD2 gene expression. In contrast, DEHT treatment did not impair cell viability or increase LDH release but did lead to a modest elevation of ROS (11–14%) and upregulation of antioxidant genes, including SOD1.

Transmission electron microscopy (TEM) was employed to examine ultrastructural features in EA.hy926 cells treated with 100 µg/mL of either compound for 48 hours. No significant morphological abnormalities or subcellular damage were observed under these experimental conditions.

These findings indicate that DINP adversely affects the cellular oxidative stress response and compromises antioxidant gene expression, while DEHT appears to activate antioxidant pathways without negatively impacting cell viability.

KEY WORDS. Reactive oxygen species, antioxidant response, oxidative stress, plasticizers and endocrine disruptors.

Introducción

La producción mundial de plásticos ha experimentado un crecimiento exponencial en las últimas décadas, superando las 320 millones de toneladas al año (Wright & Kelly, 2017). Este incremento ha venido acompañado de una creciente demanda de plastificantes, compuestos químicos esenciales para conferir flexibilidad, durabilidad y facilidad de procesamiento a los polímeros plásticos, alcanzando un consumo estimado de 7.5 millones de toneladas anuales (Poitou et al., 2022). Dentro de este grupo, los ésteres de ftalato (PAEs, por sus siglas en inglés) se destacan como los plastificantes más utilizados a nivel global (Gerofke et al., 2024).

Los ftalatos se incorporan ampliamente en productos de uso cotidiano, incluyendo dispositivos médicos, prótesis dentales, juguetes infantiles (Praveena et al., 2021), envases alimentarios (Tumu et al., 2023), así como cosméticos y productos de cuidado personal (Mondal et al., 2022; Pagoni et al., 2022). Sin embargo, una característica química clave de estos compuestos es que no forman enlaces covalentes con la matriz polimérica, lo que facilita su liberación al ambiente por procesos de migración, evaporación o lixiviación (Tuan Tran et al., 2022). Como consecuencia, los ftalatos se han identificado como contaminantes en suelos (Y. Li et al., 2023; Lü et al., 2018), agua dulce y aguas residuales (Gao & Wen, 2016; Vasseghian et al., 2023) e incluso en polvo doméstico (L.-B. Chen et al., 2024; C. Wang et al., 2025).

La exposición humana a ftalatos ocurre principalmente por ingestión, inhalación y absorción dérmica (Y. Wang & Qian, 2021), lo cual ha generado una

creciente preocupación debido a la asociación entre su exposición y posibles efectos adversos sobre la salud (Chang et al., 2021; Eales et al., 2022). Estudios previos han documentado el papel de los ftalatos como disruptores endócrinos y reproductivos, dada su capacidad para interferir con la acción de las hormonas sexuales (Hu et al., 2024; L.-L. Liu et al., 2024; Martínez-Ibarra et al., 2024; Pan et al., 2024; Yin et al., 2024) .

Con el fin de reducir el riesgo asociado con los ftalatos tradicionales, se han propuesto plastificantes alternativos como el tereftalato de di-(2-etilhexilo) (DEHT), que es un isómero estructural del DEHP. A diferencia del DEHP, que es un orto-ftalato ampliamente estudiado y clasificado como disruptor endócrino, el DEHT es un para-ftalato cuya toxicidad ha sido mucho menos explorada (Larsson et al., 2021).

Otro plastificante ampliamente utilizado es el diisononil ftalato (DINP), que se emplea en productos de PVC presentes en suplementos nutricionales, productos farmacéuticos y artículos de cuidado personal (Kehinde et al., 2024). La producción industrial de DINP ha aumentado progresivamente, representando aproximadamente el 30% del mercado global de plastificantes (Gu et al., 2021), junto con el DIDP. Sin embargo, el DINP también ha sido asociado con efectos adversos cardiovasculares, como el aumento de la presión arterial (Deng et al., 2019), con citotoxicidad y disfunción fisiológica en células endoteliales humanas microvasculares (HMEC-1) (Poitou et al., 2022). Asimismo, se ha reportado que el metabolito MEHP, derivado del DEHP, induce muerte celular mediada por ROS y autogénesis en células EA.hy926 (N. Liu et al., 2017a; Wu et al., 2017).

La línea celular EA.hy926 como modelo para estudios endoteliales y de estrés oxidativo

La línea celular EA.hy926, derivada de la fusión de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) con la línea celular de carcinoma pulmonar A549, presenta características morfológicas, fenotípicas y generales propias de las células endoteliales macrovasculares humanas. Estas propiedades hacen de EA.hy926 un modelo *in vitro* adecuado para evaluar efectos citotóxicos sobre el endotelio, así como los cambios en la expresión génica tras la exposición a tóxicos como plastificantes (Kokai et al., 2022), metales pesados como el metilmercurio (S. Liu et al., 2020) y otros contaminantes.

En los organismos vivos, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es una consecuencia inevitable de los procesos metabólicos, especialmente de la respiración mitocondrial. Para evitar su acumulación y los daños oxidativos asociados, existen sistemas de eliminación y neutralización altamente regulados que mantienen sus niveles bajo control fisiológico. Sin embargo, este equilibrio puede romperse ante la exposición a compuestos tóxicos, lo que resulta en estrés oxidativo, el agotamiento de antioxidantes de bajo peso molecular, la inactivación de enzimas antioxidantes, y daño celular (Abdelazim & Abomughaid, 2024; Averill-Bates, 2024; De Almeida et al., 2022; Lushchak, 2014). Por ejemplo, se ha reportado que el DINP induce estrés oxidativo en células de granulosa ovárica murina, aumentando los niveles de malondialdehído (MDA) y disminuyendo la actividad de la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD) (J. Chen et al., 2022). Del mismo modo, (Gutiérrez-García et al., 2019a)

encontraron que el tratamiento con DINP incrementó los niveles de ROS en células HepG2.

En este contexto, y considerando la amplia utilización de plastificantes como el DINP y DEHT así como la escasez de estudios centrados en sus efectos sobre el endotelio y la regulación metabólica, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el impacto del DINP y el DEHT sobre la viabilidad celular, la generación de ROS, la muerte celular y la expresión de genes antioxidantes en células endoteliales humanas EA.hy926.

Objetivos

Objetivo General

Elucidar los efectos citotóxicos y los cambios en la expresión génica inducidas por el diisononil ftalato (DINP) y el di(2-etilhexil) tereftalato (DEHT) en células endoteliales vasculares humanas (EA.hy926).

Objetivos Específicos

1. Evaluar los efectos del DINP y el DEHT sobre la viabilidad celular en células EA.hy926.
2. Cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células EA.hy926 tras la exposición a DINP y DEHT.
3. Analizar los cambios en la expresión de genes asociados con la respuesta al estrés oxidativo en células EA.hy926 expuestas a DINP y DEHT.
4. Examinar las alteraciones morfológicas y ultraestructurales en célulasEA.hy926 inducidas por la exposición a DINP y DEHT.

Capítulo 1. Efectos de DINP y DEHT sobre el equilibrio redox en células endoteliales EA.hy926

En este primer capítulo de la tesis se aborda el impacto de dos plastificantes ampliamente utilizados, el diisononil ftalato (DINP) y el di(2-etilhexil) tereftalato (DEHT), sobre la viabilidad celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la respuesta antioxidante en células endoteliales humanas EA.hy926. Esta línea celular, derivada de la fusión entre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) y la línea tumoral A549, ha demostrado ser un modelo *in vitro* confiable para el estudio de procesos relacionados con la función endotelial y la toxicidad inducida por compuestos xenobióticos.

Este trabajo da continuidad a investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio con otros ftalatos, utilizando diferentes modelos celulares, entre ellos células troncales hematopoyéticas y células hepáticas HepG2.

El objetivo principal de este capítulo fue evaluar el perfil citotóxico de DINP y DEHT en células EA.hy926, mediante el análisis de la viabilidad celular (ensayos MTT y LDH), la producción de ROS (ensayo DCFDA) y la expresión de genes antioxidantes clave como NFE2L2, SOD1, TXN y TXNRD2, evaluados por qRT-PCR.

Entre los hallazgos más relevantes se observó que DINP induce un aumento dosis-dependiente de ROS, reduce la viabilidad celular y disminuye la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante, mientras que DEHT, si bien también incrementa los niveles de ROS, no compromete la viabilidad celular y promueve una sobreexpresión de los genes antioxidantes evaluados, incluyendo SOD1. Estos resultados sugieren un posible mecanismo compensatorio en las

células expuestas a DEHT y un perfil tóxico diferencial frente al observado con DINP.

Este capítulo establece las bases para futuras investigaciones centradas en la caracterización molecular del estrés oxidativo inducido por plastificantes y sus posibles implicaciones en patologías asociadas al daño endotelial.

De este capítulo se generó la siguiente publicación:

Diisononyl phthalate down-regulates the expression of antioxidant genes NFE2L2, TXN, and TXNRD2, while diethyl-hexyl terephthalate up-regulates their expression including SOD-1

Torres-García, D. A., Balderas-Hernández, V. E., Barba de la Rosa, A. P., & De Leon-Rodriguez, A. (2025). Diisononyl phthalate down-regulates the expression of antioxidant genes *NFE2L2*, *TXN*, and *TXNRD2*, while diethyl-hexyl terephthalate up-regulates their expression including *SOD-1*. *Xenobiotica*, 1–11.
<https://doi.org/10.1080/00498254.2025.2493619>

Capítulo 2. Evaluación ultraestructural de células EA.hy926 expuestas a DINP y DEHT mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Introducción

Los plastificantes son aditivos químicos de amplia utilización industrial, con un consumo global estimado en aproximadamente 7.5 millones de toneladas anuales. Estos compuestos se incorporan a plásticos rígidos (por ejemplo, policloruro de vinilo, PVC) para conferirles flexibilidad y elasticidad, y están presentes en una gran variedad de productos de uso cotidiano, incluidos empaques de alimentos, juguetes y dispositivos médicos (Poitou et al., 2022). Entre los plastificantes, los ftalatos han sido históricamente los más empleados; sin embargo, se ha demostrado que varios de ellos poseen propiedades como disruptores endocrinos y efectos citotóxicos en distintos sistemas biológicos (Torres-García et al., 2025). En particular, el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), uno de los más comunes, ha sido objeto de restricciones regulatorias debido a sus efectos adversos sobre la reproducción y el desarrollo. En años recientes, marcos normativos como REACH, en la Unión Europea, han impulsado la sustitución de los ftalatos de mayor preocupación por plastificantes alternativos, como los ftalatos de cadena larga —por ejemplo, el diisononil ftalato (DINP)— y compuestos no ftálicos, como el di(2-etilhexil) tereftalato (DEHT) (Poitou et al., 2022).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una herramienta clave para el análisis morfológico ultraestructural en estudios de toxicidad celular. Su alta resolución permite observar con detalle alteraciones subcelulares inducidas

por agentes tóxicos, como daño en los orgánulos, reorganización nuclear o pérdida de integridad de membranas. Este nivel de análisis facilita distinguir entre distintas formas de daño o muerte celular, en función de sus características morfológicas (Perrotta, 2025). En este contexto, el análisis ultraestructural mediante TEM adquiere un valor particular para evaluar el daño subcelular en células endoteliales expuestas a plastificantes.

El presente capítulo de tesis se centra, en la aplicación de la TEM para examinar la morfología interna de células EA.hy926 tras la exposición al DINP y al DEHT, con el propósito de identificar cambios ultraestructurales indicativos de daño subcelular y así contribuir a una comprensión más profunda de los efectos citotóxicos comparativos de estos plastificantes.

Materiales y métodos

Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las células EA.hy926 fueron sembradas y tratadas con 100 µg/mL de DINP o DEHT durante 48 horas bajo condiciones estándar de cultivo. Posteriormente, las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y fijadas con glutaraldehído al 4% (v/v) en tampón fosfato de Sørensen (pH 7.4) a 4 °C durante 2 horas. La postfijación se realizó con tetróxido de osmio al 1% (p/p) en el mismo tampón durante 1 hora a 4 °C.

Las muestras se deshidrataron mediante una serie de soluciones de etanol en concentraciones crecientes (30%, 50%, 75%, 95% y 100%), con una duración de 10 minutos por cada paso. Las muestras deshidratadas se infiltraron e incluyeron en resina epóxica, y se polimerizaron a 60 °C durante 48 horas.

Se obtuvieron secciones ultrafinas utilizando un ultramicrotomo, las cuales se recolectaron en rejillas de cobre. Para mejorar el contraste de los orgánulos celulares, las secciones fueron teñidas secuencialmente con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa durante 15 minutos, y citrato de plomo al 0.2% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Las micrografías fueron adquiridas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se capturaron imágenes representativas a diferentes aumentos (2,500× y 15,000×) con el fin de evaluar la morfología subcelular, incluyendo la integridad mitocondrial, vacuolización y alteraciones nucleares, incluyendo la integridad mitocondrial, vacuolización y alteraciones nucleares.

Resultados

Efecto del DINP y DEHT sobre la estructura y morfología celular

El análisis de las micrografías obtenidas mediante TEM de las células tratadas con 100 µg/mL de DINP o DEHT durante 48 horas no reveló diferencias morfológicas ni ultraestructurales entre las células control y aquellas tratadas con DINP o DEHT. Tampoco se observaron características típicas de daño celular, como hinchazón mitocondrial, condensación de cromatina o fragmentación nuclear. Estos hallazgos sugieren que la exposición a 100 µg/mL de DINP o DEHT durante 48 horas no induce cambios morfológicos detectables a nivel ultraestructural en células endoteliales EA.hy926.

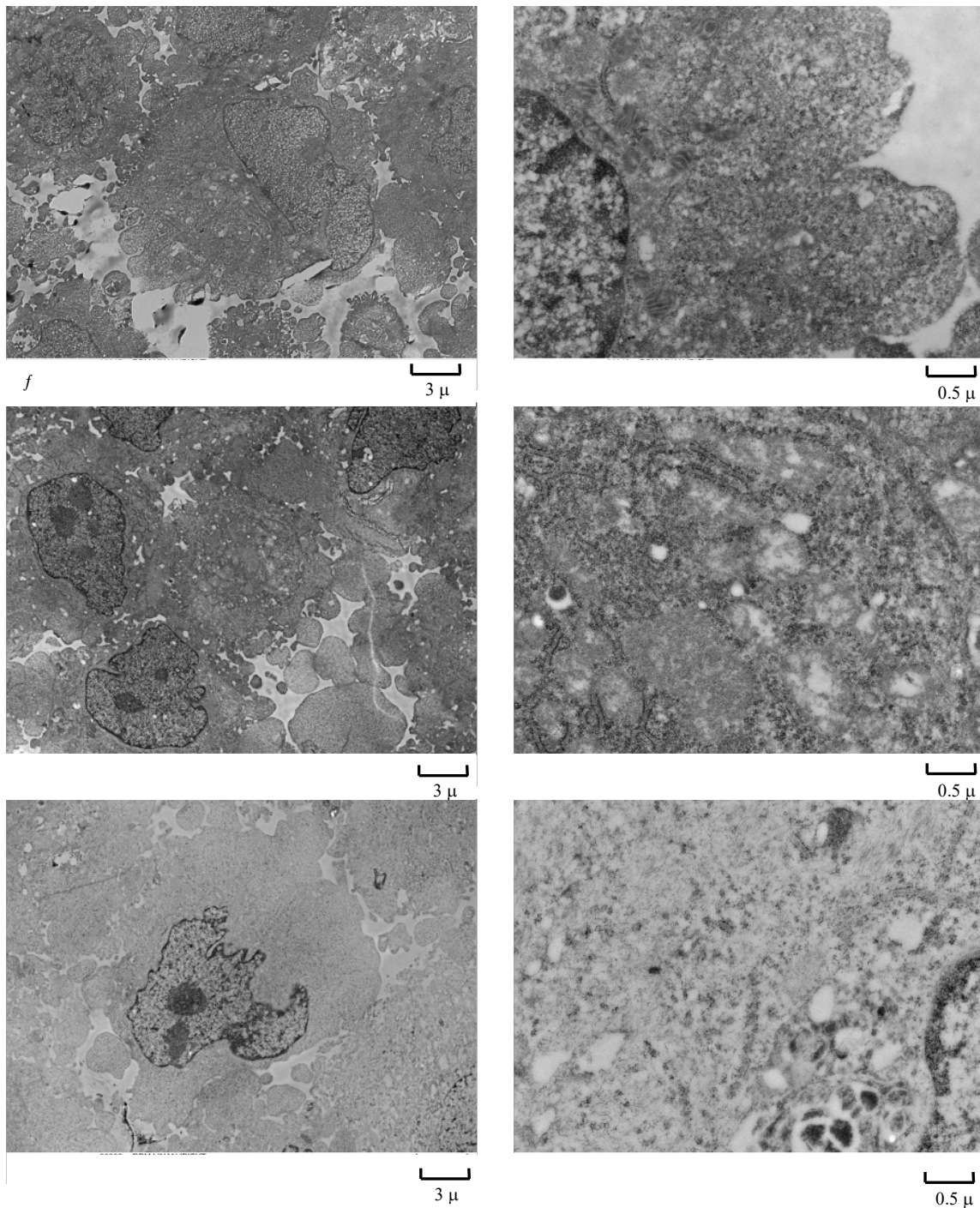


Figura 1. Micrografías representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células EA.hy926 expuestas a DINP (fila central) y DEHT (fila inferior) a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, en comparación con las células control (fila superior). Los paneles de la izquierda muestran imágenes a menor aumento (barra de escala: 3 μm), en las que se aprecia la célula completa, incluyendo núcleo y citoplasma, para observar la arquitectura celular general. Los paneles de la derecha presentan imágenes a mayor aumento (barra de escala: 0.5 μm), con un acercamiento del citoplasma que permite detallar estructuras subcelulares.

Discusión General

El estrés oxidativo es un proceso fisiológico común, originado por un desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos antioxidantes celulares (Ortlund et al., 2024; Sies, 2020). Este desequilibrio puede inducir daño molecular y desempeñar un papel central en la fisiopatología de diversas enfermedades crónicas, incluyendo la degeneración retiniana, la nefropatía, la cardiomiopatía diabética y múltiples afecciones cardiovasculares (Hosseini et al., 2024; M. Li et al., 2024; W. Wang & Kang, 2020; Xie et al., 2024).

Las células cuentan con un sistema antioxidante sofisticado, que incluye enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el sistema tioredoxina/tioredoxina reductasa (TXN/TXNRD2), los cuales contrarrestan el exceso de ROS (Jomova et al., 2023). Sin embargo, diversos xenobióticos, como los ftalatos, pueden superar estas defensas, favoreciendo la producción excesiva de ROS y alterando el equilibrio redox celular (Colbeich Da Silveira & Chies, 2024; Ramadan et al., 2020; Wen et al., 2022).

En esta tesis, se evidenció que el DINP presenta un efecto citotóxico dosis-dependiente en células EA.hy926, manifestado por la disminución de la viabilidad celular, el aumento en la liberación de LDH y la elevación en la producción de ROS. Por el contrario, aunque el DEHT también indujo ROS, no redujo de forma significativa la viabilidad celular, lo que sugiere mecanismos biológicos distintos entre ambos plastificantes.

Se observó una regulación opuesta de genes antioxidantes: el DINP reprimió significativamente la expresión de NFE2L2, TXN y TXNRD2, mientras que el DEHT promovió su sobreexpresión, incluyendo la de SOD-1. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos donde DINP, DBP y DEHP demostraron citotoxicidad en células de granulosa ovárica, HepG2 y L929 (J. Chen et al., 2022; Eljezi et al., 2017; Gutiérrez-García et al., 2019b). En nuestro modelo, el DINP redujo la viabilidad en un 11–17% tras 48–72 h, una cifra algo menor a la reportada en otros trabajos, posiblemente debido a diferencias en condiciones experimentales o en la susceptibilidad de la línea celular.

Asimismo, la liberación aumentada de LDH tras la exposición a DINP indica daño en la membrana celular, coherente con lo reportado por (Revathy & Chitra, 2019) y (Wójtowicz et al., 2017), quienes documentaron este fenómeno en líneas CHO y neuronas corticales, respectivamente.

En esta tesis, no se observaron cambios ultraestructurales discernibles en células EA.hy926 tratadas con DINP o DEHT al ser analizadas mediante TEM. Esto contrasta con reportes previos que indican que ciertos ftalatos, como el MEHP, pueden inducir procesos de autofagia, evidenciados por un aumento en la presencia de autofagosomas (Gan et al., 2020). De forma similar, la exposición al DBP en peces cebra provoca alteraciones mitocondriales, incluyendo reducción en el tamaño mitocondrial y un incremento significativo en la proporción de crestas mitocondriales dañadas, a concentraciones de 43.8 y 453.9 $\mu\text{g/L}$ (Fan et al., 2024).

La ausencia de cambios ultraestructurales evidentes podría indicar una menor toxicidad del DINP y el DEHT en comparación con el MEHP o el DBP. Se

ha reportado que el DBP, el DEHP y su metabolito MEHP presentan mayor toxicidad que los ftalatos de cadena larga (Jung Koo & Mu Lee, 2005; N. Liu et al., 2017b; Y. Zhang et al., 2022)

La disminución de NFE2L2, que codifica al factor de transcripción NRF2 — clave en la activación de genes antioxidantes—, podría aumentar la vulnerabilidad celular frente al daño oxidativo. Estudios previos han vinculado la supresión de NFE2L2/NRF2 con mayor riesgo de muerte celular y activación de vías apoptóticas (Amara et al., 2020; Sun et al., 2015; L. Zhang et al., 2018).

En cambio, la sobreexpresión de genes antioxidantes inducida por el DEHT podría representar un mecanismo compensatorio que explica su perfil no citotóxico a pesar del incremento en ROS. Este tipo de respuesta adaptativa ha sido reportada en otros estudios sobre DEHT y DEHP (Xu et al., 2021; W.-K. Yang et al., 2018).

En conjunto, los hallazgos sugieren que el DINP ejerce un mayor efecto citotóxico, afectando tanto la integridad celular como la capacidad antioxidante, mientras que el DEHT parece inducir una respuesta protectora. La expresión diferencial de genes antioxidantes podría servir como biomarcador para evaluar la toxicidad de plastificantes emergentes. No obstante, se debe considerar que la expresión génica no siempre se traduce directamente en actividad funcional, y que los productos metabólicos también pueden influir en la toxicidad (Duan et al., 2018; Kambia et al., 2021; S. Yang et al., 2021)

Conclusiones Generales

Los resultados de esta tesis muestran que el DINP y el DEHT tienen efectos distintos sobre células endoteliales EA.hy926.

El DINP reduce la viabilidad celular de forma dosis-dependiente, aumenta la producción de ROS y disminuye la expresión de genes antioxidantes, indicando mayor citotoxicidad. En cambio, el DEHT genera ROS pero no afecta la viabilidad celular, posiblemente por la activación compensatoria de genes antioxidantes.

A nivel ultraestructural, ninguno de los dos compuestos causa alteraciones morfológicas tras 48 horas de exposición a 100 µg/mL, lo que sugiere menor citotoxicidad estructural en comparación con ftalatos más tóxicos como el DBP o el MEHP.

Estos hallazgos refuerzan la preocupación sobre la seguridad del DINP y subrayan la necesidad de estudios adicionales sobre los efectos a largo plazo de estos plastificantes.

Referencias

- Abdelazim, A. M., & Abomughaid, M. M. (2024). Oxidative stress: An overview of past research and future insights. *All Life*, 17(1), 2316092.
<https://doi.org/10.1080/26895293.2024.2316092>
- Amara, I., Salah, A., Timoumi, R., Annabi, E., Scuto, M., Trovato, A., Neffati, F., Calabrese, V., & Abid-Essefi, S. (2020). Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate on Nrf2-regulated glutathione homeostasis in mouse kidney. *Cell Stress and Chaperones*, 25(6), 919–928. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01127-8>
- Averill-Bates, D. (2024). Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1871(2), 119573.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119573>
- Chang, W.-H., Herianto, S., Lee, C.-C., Hung, H., & Chen, H.-L. (2021). The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *Science of The Total Environment*, 786, 147371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147371>
- Chen, J., Yang, S., Ma, B., Wang, J., & Chen, J. (2022). Di-isononyl phthalate induces apoptosis and autophagy of mouse ovarian granulosa cells via oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 242, 113898.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113898>
- Chen, L.-B., Gao, C.-J., Zhang, Y., Shen, H.-Y., Lu, X.-Y., Huang, C., Dai, X., Ye, J., Jia, X., Wu, K., Yang, G., Xiao, H., & Ma, W.-L. (2024). Phthalate Acid Esters (PAEs) in Indoor Dust from Decoration Material Stores: Occurrence, Sources, and Health Risks. *Toxics*, 12(7), 505. <https://doi.org/10.3390/toxics12070505>
- Colbeich Da Silveira, E., & Chies, J. A. B. (2024). Intra-uterus phthalate exposure, ROS formation and altered mitochondrial D-loop methylation pattern at birth as potential

- triggers and markers of Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 187, 111355.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2024.111355>
- De Almeida, A. J. P. O., De Oliveira, J. C. P. L., Da Silva Pontes, L. V., De Souza Júnior, J. F., Gonçalves, T. A. F., Dantas, S. H., De Almeida Feitosa, M. S., Silva, A. O., & De Medeiros, I. A. (2022). ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2022/1225578>
- Deng, T., Xie, X., Duan, J., & Chen, M. (2019). Exposure to diisononyl phthalate induced an increase in blood pressure through activation of the ACE/ AT1R axis and inhibition of NO production. *Toxicology Letters*, 309, 42–50.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.011>
- Duan, J., Kang, J., Qin, W., Deng, T., Liu, H., Li, B., Yu, W., Gong, S., Yang, X., & Chen, M. (2018). Exposure to formaldehyde and diisononyl phthalate exacerbate neuroinflammation through NF-κB activation in a mouse asthma model. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 356–364.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.089>
- Eales, J., Bethel, A., Galloway, T., Hopkinson, P., Morrissey, K., Short, R. E., & Garside, R. (2022). Human health impacts of exposure to phthalate plasticizers: An overview of reviews. *Environment International*, 158, 106903.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106903>
- Eljezi, T., Pinta, P., Richard, D., Pinguet, J., Chezal, J.-M., Chagnon, M.-C., Sautou, V., Grimandi, G., & Moreau, E. (2017). In vitro cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line. *Chemosphere*, 173, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.026>

- Fan, X., Zhang, D., Hou, T., Zhang, Q., Tao, L., Bian, C., & Wang, Z. (2024). Mitochondrial DNA Stress-Mediated Health Risk to Dibutyl Phthalate Contamination on Zebrafish (*Danio rerio*) at Early Life Stage. *Environmental Science & Technology*, 58(18), 7731–7742. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c10175>
- Gan, Y., Yang, D., Yang, S., Wang, J., Wei, J., & Chen, J. (2020). Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) induces apoptosis and autophagy of mouse GC-1 spg cells. *Environmental Toxicology*, 35(2), 292–299. <https://doi.org/10.1002/tox.22866>
- Gao, D.-W., & Wen, Z.-D. (2016). Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, 541, 986–1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>
- Gerofke, A., Lange, R., Vogel, N., Schmidt, P., Weber, T., David, M., Frederiksen, H., Baken, K., Govarts, E., Gilles, L., Martin, L. R., Martinsone, Ž., Santonen, T., Schoeters, G., Scheringer, M., Domínguez-Romero, E., López, M. E., Calvo, A. C., Koch, H. M., ... Kolossa-Gehring, M. (2024). Phthalates and substitute plasticizers: Main achievements from the European human biomonitoring initiative HBM4EU. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 259, 114378. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2024.114378>
- Gu, Y., Gao, M., Zhang, W., Yan, L., Shao, F., & Zhou, J. (2021). Exposure to phthalates DEHP and DINP May lead to oxidative damage and lipidomic disruptions in mouse kidney. *Chemosphere*, 271, 129740. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129740>
- Gutiérrez-García, A. K., Choudhury, M., & De Leon-Rodriguez, A. (2019a). Diisononyl Phthalate Differentially Affects Sirtuin Expression in the HepG2 Cell Line.

Chemical Research in Toxicology, 32(9), 1863–1870.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00206>

Gutiérrez-García, A. K., Choudhury, M., & De Leon-Rodriguez, A. (2019b). Diisononyl

Phthalate Differentially Affects Sirtuin Expression in the HepG2 Cell Line.

Chemical Research in Toxicology, 32(9), 1863–1870.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00206>

Hosseini, A., Firouzeh, G., Zeinab, K., & Gholamreza, D. (2024). Quercetin prevents kidney against diabetes mellitus (type 1) in rats by inhibiting TGF- β /apelin gene

expression. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 677. [https://doi.org/10.1007/s11033-](https://doi.org/10.1007/s11033-024-09617-z)

024-09617-z

Hu, W., Jin, Z., Wang, H., Wang, F., & Qu, F. (2024). Relationship between phthalates

exposure, risk of decreased ovarian reserve, and oxidative stress levels. *Toxicology*

and Industrial Health, 40(4), 156–166. <https://doi.org/10.1177/07482337241229761>

Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., &

Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and

antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97(10), 2499–

2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

Jung Koo, H., & Mu Lee, B. (2005). Human Monitoring of Phthalates and Risk

Assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68(16),

1379–1392. <https://doi.org/10.1080/15287390590956506>

Kambia, N., Séverin, I., Farce, A., Dahbi, L., Dine, T., Moreau, E., Sautou, V., & Chagnon,

M.-C. (2021). Comparative Effects of Di-(2-ethylhexyl)phthalate and Di-(2-

ethylhexyl)terephthalate Metabolites on Thyroid Receptors: In Vitro and In Silico

Studies. *Metabolites*, 11(2), 94. <https://doi.org/10.3390/metabo11020094>

- Kehinde, S. A., Olajide, A. T., Ore, A., Praveena, S. M., Ataya, F. S., & El-Gazzar, A. M. (2024). Assessment of neuro-pulmonary crosstalk in asthmatic mice: Effects of DiNP exposure on cellular respiration, mitochondrial oxidative status and apoptotic signaling. *Scientific Reports*, *14*(1), 14712. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65356-y>
- Kokai, D., Stanic, B., Tesic, B., Samardzija Nenadov, D., Pogrmic-Majkic, K., Fa Nedeljkovic, S., & Andric, N. (2022). Dibutyl phthalate promotes angiogenesis in EA.hy926 cells through estrogen receptor-dependent activation of ERK1/2, PI3K-Akt, and NO signaling pathways. *Chemico-Biological Interactions*, *366*, 110174. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110174>
- Larsson, L., Sandgren, P., Ohlsson, S., Derving, J., Friis-Christensen, T., Daggert, F., Frizi, N., Reichenberg, S., Chatellier, S., Diedrich, B., Antovic, J., Larsson, S., & Uhlin, M. (2021). Non-phthalate plasticizer DEHT preserves adequate blood component quality during storage in PVC blood bags. *Vox Sanguinis*, *116*(1), 60–70. <https://doi.org/10.1111/vox.12982>
- Li, M., Xu, Q., Fan, Q., Li, H., Zhang, Y., Jiang, F., & Qu, Y. (2024). Small molecule SIRT1 activators counteract oxidative stress-induced inflammasome activation and nucleolar stress in retinal degeneration. *International Immunopharmacology*, *142*, 113167. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113167>
- Li, Y., Cheng, S., Fang, H., Yang, Y., Guo, Y., Zhou, Y., & Shi, F. (2023). Composition, distribution, health risks, and drivers of phthalates in typical red paddy soils. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(41), 94814–94826. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28815-z>

- Liu, L.-L., Yue, J.-Z., Lu, Z.-Y., Deng, R.-Y., Li, C.-C., Yu, Y.-N., Zhou, W.-J., Lin, M., Gao, H.-T., Liu, J., & Xia, L.-Z. (2024). Long-term exposure to the mixture of phthalates induced male reproductive toxicity in rats and the alleviative effects of quercetin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 483, 116816.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.116816>
- Liu, N., Jiang, L., Sun, X., Yao, X., Zhai, X., Liu, X., Wu, X., Bai, Y., Wang, S., & Yang, G. (2017a). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induced ROS-dependent autophagic cell death in human vascular endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, 44, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.024>
- Liu, N., Jiang, L., Sun, X., Yao, X., Zhai, X., Liu, X., Wu, X., Bai, Y., Wang, S., & Yang, G. (2017b). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induced ROS-dependent autophagic cell death in human vascular endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, 44, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.024>
- Liu, S., Tsui, M. T.-K., Lee, E., Fowler, J., & Jia, Z. (2020). Uptake, efflux, and toxicity of inorganic and methyl mercury in the endothelial cells (EA.hy926). *Scientific Reports*, 10(1), 9023. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66444-5>
- Lü, H., Mo, C.-H., Zhao, H.-M., Xiang, L., Katsoyiannis, A., Li, Y.-W., Cai, Q.-Y., & Wong, M.-H. (2018). Soil contamination and sources of phthalates and its health risk in China: A review. *Environmental Research*, 164, 417–429.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.03.013>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>

- Martínez-Ibarra, A., Cerbón, M., Martínez-Razo, L. D., Morales-Pacheco, M., Torre-Villalvazo, I., Kawa, S., & Rodríguez-Dorantes, M. (2024). Impact of DEHP exposure on female reproductive health: Insights into uterine effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 107, 104391.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104391>
- Mondal, T., Mondal, S., Ghosh, S. K., Pal, P., Soren, T., Pandey, S., & Maiti, T. K. (2022). Phthalates—A family of plasticizers, their health risks, phytotoxic effects, and microbial bioaugmentation approaches. *Environmental Research*, 214, 114059.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114059>
- Ortlund, K. E., Schantz, S. L., Aguiar, A., Merced-Nieves, F. M., Woodbury, M. L., Goin, D. E., Calafat, A. M., Milne, G. L., & Eick, S. M. (2024). Oxidative stress as a potential mechanism linking gestational phthalates exposure to cognitive development in infancy. *Neurotoxicology and Teratology*, 106, 107397.
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2024.107397>
- Pagoni, A., Arvaniti, O. S., & Kalantzi, O.-I. (2022). Exposure to phthalates from personal care products: Urinary levels and predictors of exposure. *Environmental Research*, 212, 113194. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113194>
- Pan, J., Liu, P., Yu, X., Zhang, Z., & Liu, J. (2024). The adverse role of endocrine disrupting chemicals in the reproductive system. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1324993. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1324993>
- Perrotta, I. (2025). Live and let die: Analyzing ultrastructural features in cell death. *Ultrastructural Pathology*, 49(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1080/01913123.2024.2428703>

- Poitou, K., Rogez-Florent, T., Dirninger, A., Corbière, C., & Monteil, C. (2022). Effects of DEHP, DEHT and DINP Alone or in a Mixture on Cell Viability and Mitochondrial Metabolism of Endothelial Cells In Vitro. *Toxics*, 10(7).
<https://doi.org/10.3390/toxics10070373>
- Praveena, S. M., Siok Fong, C., & Amaruddin, A. F. (2021). Phthalates in children toys available in Malaysian market: Quantification and potential human health risk. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 213, 105955.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105955>
- Ramadan, M., Cooper, B., & Posnack, N. G. (2020). Bisphenols and phthalates: Plastic chemical exposures can contribute to adverse cardiovascular health outcomes. *Birth Defects Research*, 112(17), 1362–1385. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1752>
- Sies, H. (2020). Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>
- Sun, X., Lin, Y., Huang, Q., Shi, J., Qiu, L., Kang, M., Chen, Y., Fang, C., Ye, T., & Dong, S. (2015). Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS -1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(3), 581–594. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12409>
- Torres-García, D. A., Balderas-Hernández, V. E., Barba De La Rosa, A. P., & De Leon-Rodriguez, A. (2025). Diisononyl phthalate down-regulates the expression of antioxidant genes *NFE2L2* , *TXN* , and *TXNRD2* , while diethyl-hexyl terephthalate up-regulates their expression including *SOD-1*. *Xenobiotica*, 55(2), 110–120.
<https://doi.org/10.1080/00498254.2025.2493619>

- Tuan Tran, H., Lin, C., Bui, X.-T., Ky Nguyen, M., Dan Thanh Cao, N., Mukhtar, H., Giang Hoang, H., Varjani, S., Hao Ngo, H., & Nghiem, L. D. (2022). Phthalates in the environment: Characteristics, fate and transport, and advanced wastewater treatment technologies. *Bioresource Technology*, 344, 126249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126249>
- Tumu, K., Vorst, K., & Curtzwiler, G. (2023). Endocrine modulating chemicals in food packaging: A review of phthalates and bisphenols. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(2), 1337–1359. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13113>
- Vasseghian, Y., Alimohamadi, M., Dragoi, E.-N., & Sonne, C. (2023). A global meta-analysis of phthalate esters in drinking water sources and associated health risks. *Science of The Total Environment*, 903, 166846. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166846>
- Wang, C., Gong, S., Cao, Y., Liu, M., Zhang, W., Zhang, X., Fan, L., Li, L., Du, H., Tysklind, M., Yang, X., & Wang, X. (2025). Characterization and sources of childhood PAEs exposure from residential airborne dust in China cities. *Journal of Environmental Sciences*, 152, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2024.04.028>
- Wang, W., & Kang, P. M. (2020). Oxidative Stress and Antioxidant Treatments in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*, 9(12), 1292. <https://doi.org/10.3390/antiox9121292>
- Wang, Y., & Qian, H. (2021). Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare*, 9(5), 603. <https://doi.org/10.3390/healthcare9050603>
- Wen, Z.-J., Wang, Z.-Y., & Zhang, Y.-F. (2022). Adverse cardiovascular effects and potential molecular mechanisms of DEHP and its metabolites—A review. *Science*

of *The Total Environment*, 847, 157443.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157443>

Wójtowicz, A. K., Szychowski, K. A., Wnuk, A., & Kajta, M. (2017). Dibutyl Phthalate (DBP)-Induced Apoptosis and Neurotoxicity are Mediated via the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) but not by Estrogen Receptor Alpha (ER α), Estrogen Receptor Beta (ER β), or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) in Mouse Cortical Neurons. *Neurotoxicity Research*, 31(1), 77–89. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9665-x>

Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environmental Science & Technology*, 51(12), 6634–6647. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>

Wu, X., Jiang, L., Sun, X., Yao, X., Bai, Y., Liu, X., Liu, N., Zhai, X., Wang, S., & Yang, G. (2017). Mono(2-ethylhexyl) phthalate induces autophagy-dependent apoptosis through lysosomal-mitochondrial axis in human endothelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.069>

Xie, L., Yu, Z.-Q., Zhang, R., Zhang, Z.-P., Zhang, Y., Jin, M.-Y., Ju, Y., Zhao, X.-H., & Guo, J.-P. (2024). Phloridzin prevents diabetic cardiomyopathy by reducing inflammation and oxidative stress. *European Journal of Pharmacology*, 984, 177032. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.177032>

Xu, H., Cao, W., Sun, H., Zhang, S., Li, P., Jiang, S., & Zhong, C. (2021). Dose-Dependent Effects of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 658361. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.658361>

- Yang, S., Arcanjo, R. B., & Nowak, R. A. (2021). The effects of the phthalate DiNP on reproduction†. *Biology of Reproduction*, 104(2), 305–316.
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa201>
- Yang, W.-K., Chiang, L.-F., Tan, S.-W., & Chen, P.-J. (2018). Environmentally relevant concentrations of di(2-ethylhexyl)phthalate exposure alter larval growth and locomotion in medaka fish via multiple pathways. *Science of The Total Environment*, 640–641, 512–522. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.312>
- Yin, J., Liu, S., Li, Y., Hu, L., Liao, C., & Jiang, G. (2024). Exposure to MEHP during Pregnancy and Lactation Impairs Offspring Growth and Development by Disrupting Thyroid Hormone Homeostasis. *Environmental Science & Technology*, 58(8), 3726–3736. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c09756>
- Zhang, L., Li, H., Gao, M., Zhang, T., Wu, Z., Wang, Z., & Chong, T. (2018). Genistein attenuates di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular injuries via activation of Nrf2/HO-1 following prepubertal exposure. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3371>
- Zhang, Y., Lyu, L., Tao, Y., Ju, H., & Chen, J. (2022). Health risks of phthalates: A review of immunotoxicity. *Environmental Pollution*, 313, 120173.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120173>