



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

“Efecto del di (2-etil-hexil) ftalato (DEHP) y monoetil-hexil ftalato (MEHP) sobre la proliferación, migración y la transición epitelio mesénquima en las células A549”

TESIS

Que presenta:

M. EN C. LETICIA ALEJANDRA RAFAEL VÁZQUEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA

Directora de tesis

Dra. María Betzabet Quintanilla Vega

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N bajo la dirección de la Dra. María Betzabet Quintanilla Vega. La estudiante LARV contó con el apoyo del Conacyt #331399

Agradecimientos:

A mi tutora la Dra. Ma. Betzabet Quintanilla Vega, por su apoyo académico y personal, en estos años.

A mis asesores la Dra. Blanca Bazán Perkins, Dra. Andrea De Vizcaya Ruíz, Dra Ana Burguete, Dr. Olivier Barbier por sus comentarios en la escritura y elaboración de esta tesis doctoral.

De manera especial agradecer a la Dra. Blanca Bazán Perkins y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por la donación de material y el uso de instalaciones para la elaboración de este proyecto doctoral. En especial a la Dra. Blanca por todo su apoyo académico y moral a través de estos años.

Al Dr. Gamaliel Aztatzi que afronto conmigo el reto de la escritura del artículo y que ofreció sus conocimientos y experiencia en su elaboración. Agradezco también tenerte como amigo, has sido una de las personas más importantes, me apoyaste desde la maestría y parte de este grado te lo debo a ti. Te agradezco y te quiero mucho mi gran amigo.

A la Dra. Libia Vega Loyo y la M. en C. Elizabeth Estrada por su apoyo en equipo y reactivos para la técnica de timidina Tritiada.

A los profesores del departamento, por su participación y comentarios a lo largo de estos años.

A los miembros de mi laboratorio: Isabel Alvarado, Pamela Tello, Yazmín Godínez, Nereida Castro, Daniel Hernández, Gerardo Martínez y Mary Solís, por el compañerismo ofrecido en estos años, en el laboratorio 5 de toxicología.

A mis amigos y familia. El ser foráneo es algo que te permite adoptar una nueva familia, agradezco a mi dra. y a todos aquellos amigos que durante todo este tiempo fueron parte de mi vida y con los cuáles tengo gratos recuerdos

A mis hermanos: Rebeca, Mariana, Concepción, Ángel y Luis que son y han sido mi motor más importante a través de estos años, sin Uds. no sería nada.

A mi familia en general por el apoyo recibido y por soportar y entender mis ausencias en eventos familiares, a sabiendas que mi meta va más allá.

A Dios. La Fe que he tenido en estos años en ti, ha sido muy necesaria en la escritura y en la obtención de un grado. Gracias por ser esa esperanza y esa luz al final del camino.

Dedico esta tesis a todas las personas que su sueño es y fue hacer ciencia para la mejoría de este país. En especial a Uds. dos que se adelantaron, pero que arriba están viendo y apoyándome en cada decisión que tomo. Los quiero mucho.

RESUMEN

El di (2-etil-hexil) ftalato (DEHP) es un plastificante ampliamente utilizado en la industria del plástico en una gran variedad de productos. El DEHP ha sido prohibido desde el 2008 en la Unión Europea y los Estados Unidos de América, sin embargo, su uso en nuestro país es muy amplio. Recientemente ha sido considerado como un contaminante emergente en el mundo con efectos ambientales y en salud pública. El DEHP no se encuentra unido de manera covalente al producto plástico, por lo tanto, puede ser liberado fácilmente, y de esta manera está presente en el ambiente y entra al organismo por diferentes vías, incluyendo la inhalatoria alcanzando el epitelio alveolar. Sus efectos en el pulmón incluyen inflamación, alteración de la maduración postnatal (alveolarización), agrandamiento del espacio aéreo y cambios en la diferenciación celular, sugiriendo que el epitelio alveolar es un blanco de la acción de los ftalatos. El DEHP es metabolizado por enzimas como las lipasas, y también es oxidado y conjugado con ácido glucurónico. El metabolito descrito más importante es el monoetil-hexil ftalato (MEHP), corresponde al 12% del compuesto padre y ha sido considerado como el metabolito más tóxico. A pesar de los efectos en el pulmón, el DEHP y el MEHP no son considerados como contaminantes neumotóxicos. Las células del epitelio alveolar tipo 2 (AEC-2) son células importantes en el epitelio alveolar debido a que están relacionadas con la homeostasis del pulmón, por ejemplo, en la reparación epitelial ya que detectan el daño, secretan el surfactante y median la respuesta inflamatoria, además de que tienen la capacidad de polarizar a la célula epitelial y cambiar a un fenotipo mesenquimal, proceso conocido como transición epitelio-mesenquima (EMT, *epithelial mesenchymal transition*). La EMT es un proceso fisiológico implicado en el desarrollo y la resolución de la inflamación, y la presencia constante de la EMT en la edad adulta está relacionada con enfermedades en el pulmón, como cáncer y fibrosis pulmonar. También se ha visto que la expresión de distintos factores de crecimiento contribuye en la EMT, entre ellos: el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor derivado de plaquetas (PDGF), así como la activación de distintos receptores que pueden contribuir como factores de transcripción y de esta manera, influenciar el cambio de expresión de proteínas para propiciar una EMT. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la progresión celular, marcadores epiteliales y mesenquimales, incluyendo la secreción del surfactante en células A549 (prototipo de epitelio alveolar tipo 2: AEC2) que fueron expuestas a DEHP (1-100 μM) o MEHP (1-50 μM) durante 24-72 h. Los resultados mostraron un incremento en la proliferación celular en todas las concentraciones de cada ftalato a las 24 y 48 h. La migración celular mostró un incremento dependiente de la concentración a las 24 y 48 h para ambos ftalatos, además de que se observaron estructuras alargadas tipo-fibroblastos. Una disminución en los niveles de ambos surfactantes (SP-B y SP-C) fue observado después de la exposición a ambos ftalatos a las 48 h, y una disminución de la respuesta positiva a SP-C en las células expuestas a MEHP, sugiriendo una pérdida del fenotipo epitelial. Por otro lado, se observó una disminución en los niveles de E-cadherina y un incremento en el marcador mesenquimal, fibronectina después de la exposición a ambos ftalatos. Adicionalmente se observó un cambio en la expresión del mRNA de *PDGF*, sugiriendo que los ftalatos podrían ejercer su efecto a través de la interacción con este factor de crecimiento. Tomando en cuenta los niveles de fibronectina, el cambio en el *PDGF*, la proliferación y migración de las células, se sugiere que estas están derivando a un cambio fibrogénico. Así, nuestros resultados mostraron que el DEHP y MEHP alteran la estructura y migración de las células A549 y promueven la pérdida del fenotipo epitelial. Las

alteraciones observadas en la proliferación, migración y expresión de proteínas de la EMT fueron más pronunciadas por la exposición al MEHP comparadas con el de DEHP. De manera interesante, los niveles de las proteínas del surfactante y la expresión del mRNA del *PDGF* mostraron un efecto diferencial, lo que sugiere que ambos ftalatos actúan a través de mecanismos diferentes y que la toxicidad del DEHP no es debida solamente al MEHP, sino posiblemente también a la participación de otros metabolitos. En resumen, nuestros resultados muestran que el DEHP y su metabolito MEHP son pneumotóxicos a concentraciones consideradas ambientalmente relevantes y de esta manera podrían incrementar el riesgo de padecer enfermedades pulmonares asociadas a la disminución de surfactante y enfermedades en donde la EMT es importante, como fibrosis, síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), displasia broncopulmonar (BDP) y cáncer, por mencionar algunas.

ABSTRACT

The di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) is a plasticizer widely used in the plastic industry in a variety of products. DEHP was banned in 2008 in the European Union and USA, but its use in our country is wide. Recently, it has been considered as an emerging pollutant with environmental and public health effects. DEHP is not covalently bound to the plastic polymer, therefore it can be easily released from the plastic product and be in the environment and enter to the body through several pathways, including inhalation therefore reaching the alveolar epithelium. DEHP adverse effects on lungs include inflammation, alteration of postnatal maturation (alveolarization), enlarged airspaces and cell differentiation changes, suggesting that alveolar epithelium is a target of phthalate toxicity. The DEHP is metabolized by lipase enzymes and can be oxidized and conjugated with glucuronic acid too. The most important metabolite described is the monoethyl-hexyl phthalate (MEHP), it corresponds to 12% of the parent compound and it has been considered as the most toxic metabolite. Despite these effects on the lung, DEHP and MEHP are not considered pneumotoxic pollutants. The alveolar epithelial cells type 2 (AEC2) are important cells in alveolar epithelium, because they are related to lung homeostasis, for instance, they are implicated in the epithelial repair, since they detect the damage in alveolar epithelium, secrete the surfactant fluid, and mediate the inflammatory response. In addition, they undergo a biological process that polarizes the epithelial cells and change them to a mesenchymal phenotype known as epithelial mesenchymal transition (EMT). The EMT is a physiological process, implicated in development and inflammation resolution and the presence of EMT in adulthood is related to lung diseases such as cancer and pulmonary fibrosis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the cell progression, epithelial and mesenchymal markers, including surfactant secretion in A549 cells (prototype of alveolar epithelial cells type 2: AEC2) that were exposed to DEHP (1-100 μ M) or MEHP (1-50 μ M) for 24-72 h. The results showed an increased cell proliferation at all concentrations of each phthalate at 24 and 48 h. Cell migration showed a concentration-dependent increase at 24 and 48 h of exposure to either phthalate and enlarged structures fibroblast-type were seen. Decreased levels of both surfactants (SP-B and SP-C) were observed after the exposure to either phthalate at 48 h, and a decreased SP-C positive response was observed in cells exposed to MEHP, suggesting a loss of the epithelial phenotype. On the other hand, a decrease in the epithelial marker e-cadherin and an increase in the mesenchymal marker fibronectin were observed following exposure to either phthalate. Additionally, we observed a change in *PDGF* mRNA levels, suggesting that both phthalates can act through this growth factor. Considering the fibronectin levels, *PDGF* expression change, cell proliferation and migration, it is suggested that DEHP and MEHP alter the structure and migration of A549 cells and promote the loss of the epithelial phenotype. The alterations observed in proliferation, migration and protein expression were more pronounced after the exposure to MEHP compared to DEHP. Interestingly, surfactant protein levels and the mRNA expression of *PDGF* showed different effects, suggesting that both phthalates act through different mechanisms and that the toxicity of DEHP is due not only to MEHP but possibly to other metabolites too. In summary, our results show that DEHP and its metabolite MEHP are pneumotoxic compounds at environmentally relevant concentrations, and therefore they could increase the risk to develop lung diseases related to a decrease of surfactant or where EMT is important, such as fibrosis, acute respiratory distress syndrome (ARDS), bronchopulmonary dysplasia (BPD), among others.

INDICE

	Página
Resumen	iv
Abstract	vi
Índice de figuras	x
Índice de Tablas	xi
Lista de Abreviaturas	xii

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ftalatos	1
1.1.1 Di (2-etil-hexil) ftalato (DEHP)	2
1.1.1.1 DEHP en México	3
1.1.1.2 Toxicocinética del DEHP	3
1.1.1.3 Efectos tóxicos del DEHP	5
1.1.2 Monoetil-hexil ftalato (MEHP)	5
1.1.2.1 Efectos tóxico del MEHP	5
1.2 Transición Epitelio- Mesenquimal (EMT)	6
1.3 Desarrollo y maduración pulmonar	8
1.3.1 Neumocitos tipo I	10
1.3.2 Neumocitos tipo II	10
1.3.3 Surfactante	10
1.3.4 Factores y componentes de la homeostasis alveolar	
1.3.4.1 Factor derivado de plaquetas (PDGF)	11
1.3.4.2 Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	12
1.3.4.3 Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)	12
1.4 Efectos del DEHP y MEHP sobre la EMT	13
1.5 Justificación	13
1.6 Hipótesis	14
1.7 Objetivo general	14
1.8 Objetivos particulares	14
2. MÉTODOS	
2.1 Cultivo celular	15

2.2. Determinación de la viabilidad: cristal violeta y MTT	16
2.2.1. Citotoxicidad evaluada por el cristal violeta	16
2.2.1.1 Principio	16
2.2.1.2 Procedimiento	16
2.2.2 Citotoxicidad por el método de MTT	16
2.2.2.1 Procedimiento	17
2.3. Análisis de la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada	17
2.3.1 Principio	17
2.3.2 Procedimiento	17
2.4 Evaluación de la migración celular mediante el ensayo de herida (<i>Wound-Healing assay</i>)	18
2.4.1 Principio	18
2.4.2 Procedimiento	18
2.5 Análisis de las proteínas surfactantes SP-C y SP-B, así como E-cadherina, fibronectina y α -SMA mediante citometría de flujo	19
2.5.1 Principio	19
2.5.2 Procedimiento	19
2.5.2.1 Tinción extracelular	19
2.5.2.2 Tinción intracelular	20
2.6 Cuantificación del mRNA de los receptores de los factores de crecimiento VEGF, PDGF y SPRY	21
2.6.1 Principio	21
2.6.2 Procedimiento	
2.6.2.1 Extracción del RNA	21
2.6.2.2 Obtención del cDNA	22
2.6.2.3 Amplificación de los genes PDGF, VEGF y SPRY	22
2.7 Análisis estadístico	22
3. RESULTADOS	
3.1 Viabilidad celular	24
3.1.1 Citotoxicidad del DEHP y MEHP por la técnica del cristal violeta	24
3.1.2 Citotoxicidad del DEHP y MEHP por la técnica del MTT	25
3.2 Efecto de los ftalatos sobre la proliferación celular	27

3.3 Efecto de los ftalatos sobre la migración celular (<i>Wound-Healing assay</i>)	29
3.4 Expresión de proteínas del surfactante por exposición a los ftalatos	31
3.5 Expresión de E-cadherina por exposición al DEHP y MEHP	34
3.6 Expresión de fibronectina por exposición al DEHP y MEHP	36
3.7 Expresión de factores de crecimiento por exposición a los ftalatos	36
3.7.1 Niveles de mRNA del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	36
3.7.2 Expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)	36
3.7.3 Expresión de la proteína Sprouty (<i>Spry</i>)	39
4. DISCUSIÓN	
4.1 Efectos en la viabilidad celular	41
4.2 Efectos en la proliferación celular	42
4.3 Efectos en la migración celular	43
4.4 Efectos en la expresión de proteínas del surfactante	44
4.5 Proteínas de la transición epitelio-mesénquima (EMT):	
E-cadherina, α -SMA y fibronectina	45
4.6 Efectos del DEHP y MEHP sobre los factores de crecimiento:	
VEGF, Spry y PDGF	46
5. CONCLUSIONES	49
6. PERSPECTIVAS	50
7. REFERENCIAS	51
8. APENDICE	
8.1 Expresión del PPAR y AhR por exposición al DEHP y MEHP	57
8.1.1 Expresión del PPAR γ en las células A549	58
8.1.2 Expresión del PPAR γ en células A549 expuestas a DEHP y MEHP	58
8.1.3 Expresión del PPAR γ por el co-tratamiento con ácido retinoico	60
8.1.4 Expresión del AhR por exposición al DEHP y MEHP	60

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de ésteres de ftalatos más comunes.	2
Figura 2. Vía metabólico general para los ftalatos.	4
Figura 3. Expresión de proteínas en una transición epitelio mesénquima (EMT).	8
Figura 4. Estadios principales del desarrollo pulmonar en el ser humano.	9
Figura 5. Diagrama de flujo: Exposición al DEHP y MEHP en las células A549.	15
Figura 6. Viabilidad celular después de la exposición al DEHP.	24
Figura 7. Viabilidad celular después de la exposición al MEHP.	25
Figura 8. Actividad mitocondrial después de la exposición al DEHP.	26
Figura 9. Actividad mitocondrial después de la exposición al MEHP.	27
Figura 10. Proliferación de las células A549 por la exposición al DEHP.	28
Figura 11. Proliferación de las células A549 por la exposición al MEHP.	29
Figura 12. Migración de las células A549 por exposición al DEHP (Ensayo de la herida).	30
Figura 13. Migración de las células A549 por exposición al MEHP (Ensayo de la herida).	32
Figura 14. Estructuras alargadas de las células A549 por exposición al DEHP.	33
Figura 15. Estructuras alargadas de las células A549 por exposición al MEHP.	34
Figura 16. Expresión de las proteínas del surfactante C (SP-C) y surfactante B (SP-B) por la exposición a DEHP y MEHP.	35
Figura 17. Expresión de E-cadherina por exposición al DEHP y MEHP.	37
Figura 18. Expresión de fibronectina por exposición al DEHP y MEHP.	38
Figura 19. Expresión de <i>PDGF</i> por exposición a los ftalatos.	39
Figura 20. Expresión de <i>VEGF</i> por exposición a los ftalatos.	40
Figura 21. Expresión de <i>Spry</i> por exposición a los ftalatos.	40
Figura 22. Mecanismos de acción del DEHP y MEHP en las células A549.	48
Figura 23. Expresión de <i>PPAR</i> γ por incubación con troglitazona.	58
Figura 24. Expresión de <i>PPAR</i> γ en células A549 expuestas al DEHP.	59
Figura 25. Expresión de <i>PPAR</i> γ por exposición al MEHP.	59
Figura 26. Expresión de <i>PPAR</i> γ con el co- tratamiento con troglitazona y ácido retinoico.	60
Figura 27. Expresión del <i>AhR</i> por exposición a los ftalatos.	61

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Efectos tóxicos del DEHP sobre el pulmón.	6
Tabla 2: Efectos tóxicos del MEHP.	7
Tabla 3: Anticuerpos empleados en la cuantificación de proteínas.	20
Tabla 4: Sondas TAQMAN para los receptores de los factores de crecimiento.	22
Tabla 5: Sondas TAQMAN para los genes <i>PPARγ</i> y <i>AhR</i> .	57

ABREVIATURAS

³ [H]T	Timidina tritiada
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CYP450	Citocromo p450
DEHP	Di(2-etil-hexil) ftalato
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EMT	Transición epitelio Mesénquima
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
MEHP	Monoetil-hexil ftalato
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PBS-FACs	Amortiguador de fosfatos salino, azida de sodio y suero fetal bovino
PCV	Policloruro de vinilo
PDGF	Factor derivado de plaquetas
PDGF-A	Factor de crecimiento derivado de plaquetas A
PPAR γ	Receptor proliferador de peroxisomas gamma
RA	Ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
RT- PCR	Reacción de cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
SFB	Suero fetal bovino
SMA	Actina de músculo liso
SP -C	Surfactante C
SP-A	Surfactante A
SP-B	Surfactante B
SP-D	Surfactante D
Spry	Gen Sprouty
TGF	Factor de crecimiento transformante
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de endotelio vascular

1. Introducción

1.1 Ftalatos

Los ftalatos es un grupo de compuestos químicos, dialquil o monoalquil aril ésteres del ácido 1,2 benzenodicarboxílico que se encuentran distribuidos en el ambiente de manera ubicua; son utilizados como plastificantes que proveen flexibilidad y durabilidad a los productos plásticos como recipientes para alimentos y bebidas, maquillajes, juguetes infantiles y dispositivos médicos, por mencionar algunos. Dentro de los productos plásticos en los que se utilizan estos plastificantes destacan aquellos productos con policloruro de vinilo (PCV), y además pueden ser encontrados en productos de caucho, celulosa y estireno (EPA, 2012). Existen distintos tipos de ftalatos, y de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos de América (EUA) y a la Agencia de Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés), el 95% de los ftalatos industriales utilizados a nivel mundial corresponden al dietil-hexil ftalato (DEHP, por sus siglas en inglés) (Fig. 1). No se tienen datos reales sobre su producción, se estima que más de 470 millones de libras de ftalatos son producidos o importados en EUA, aunque se considera que este dato está subestimado, debido a que no todas las industrias que producen plásticos están obligados a brindar esta información (ATSDR, 2002; EPA, 2017). En el año 2008 se prohibió el uso de ftalatos en juguetes y artículos de cuidado infantil en EUA, por medio de la Ley de mejora de la seguridad de los productos de consumo; sin embargo, a pesar de estas acciones se han observado incrementos en el uso del DEHP comparado con los 300 millones de libras manufacturadas por año entre 1985 y 1990 (Desvergne et al., 2009). A pesar de esta prohibición, este compuesto ha sido considerado como un contaminante emergente no solamente en EUA sino también en la Unión Europea, con implicaciones adversas tanto en los ecosistemas como en salud pública (Gavrilescu et al., 2015; Net et al., 2015).

Los ftalatos pueden ser liberados con relativa facilidad, debido a que no se encuentran covalentemente unidos a la cadena del polímero que compone al plástico, por lo que se pueden lixiviar de los envases mediante calor, abrasión mecánica o por el uso de sustancias abrasivas, por mencionar algunas, y de esta manera pasar a los alimentos y bebidas, así como liberarse al ambiente. En el ambiente, los ftalatos se encuentran como consecuencia de la disposición en rellenos sanitarios de residuos municipales e industriales y también por la quema de productos plásticos (EPA, 2012). Tanto el DEHP como los demás ftalatos se

absorben fuertemente a componentes del suelo y sedimentos y rara vez son arrastrados por aguas subterráneas debido a que se disuelven muy lentamente, aunque pueden llegar a cuerpos de agua y al océano a través de descargas de aguas residuales de la industria que manufactura y procesa plásticos. Una fracción de estos compuestos se libera a la atmósfera, donde pueden sufrir reacciones fotoquímicas con radicales hidroxilos (HSDB, 1994). En el aire, los ftalatos son bastante estables y pueden viajar grandes distancias al adherirse a partículas de polvo. La liberación del DEHP al aire a partir de materiales plásticos, revestimientos y pisos en entornos domésticos y de trabajo puede conducir a una alta exposición intradomiciliaria (ATSDR, 2002). Los ftalatos pueden bioacumularse en algunos organismos acuáticos y terrestres, aunque aparente no ocurre biomagnificación a través de la cadena alimenticia debido a su rápida metabolización. (INE, 2012).







Estructura	Diéster		Metabolito Monoéster	
	Di metil ftalato	DMP	Mono metil ftalato	MMP
	Di etil ftalato	DEP	Mono etil ftalato	MEP
	Di butil ftalato	DBP	Mono butil ftalato	MBP
	Butil bencil ftalato	BBP	Mono butil ftalato Mono bencil	MBP MBeP
	Di etil hexil ftalato	DEHP	Mono etil hexil ftalato	MEHP
	Di-n-octil ftalato	DnOP	Mono-n-octil ftalato	MnOP

Figura 1. Estructura química de éster de ftalatos más comunes.
(Tomado de Clewell et al., 2010)

1.1.1 Di(2-etil-hexil) ftalato (DEHP)

El DEHP (CAS ID 117-81-7) con peso molecular de 390.56, es un compuesto químico que se añade comúnmente a los plásticos para hacerlos más flexibles, además de ser usado como aditivo en distintos productos industriales. El DEHP es un líquido incoloro casi sin olor, está

presente en una gran variedad de productos plásticos principalmente los elaborados con PVC como revestimientos de paredes, manteles, baldosas, cortinas de baño, mangueras de jardín, forros de piscinas, ropa impermeable, juguetes, zapatos, tapicería, film de embalaje, el revestimiento de bolsas de almacenamiento de cables y alambres, en una gran variedad de dispositivos médicos, así como arcillas y maquillajes. El DEHP representa el 95% de los ftalatos más utilizados a nivel mundial (EPA, 2017).

1.1.1.1 DEHP en México

El DEHP ocupa el 95% de la producción de la industria de plásticos en los EU, sin embargo, información del 2005 muestra que el uso de este producto ha disminuido (ECB, 2008). A pesar de esto, se considera que los datos del uso y producción de los ftalatos está subestimada (ATSDR, 2002).

No existe en México una regulación establecida para las concentraciones aceptables de ftalatos; sin embargo, en un estudio realizado en algunos productos plásticos de uso infantil llevado a cabo en el 2004 se observaron concentraciones de ftalatos que representaban más del 50% del peso final del producto (Bustamante-Montes et al., 2004). La concentración estimada para la ingesta diaria de ftalatos variaba desde concentraciones traza hasta 18.12 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso/día en infantes mexicanos (Corea-Téllez et al., 2008), dichos niveles no superan los niveles establecidos por la EPA para el consumo de DEHP de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso/día para una dosis crónica. Sin embargo, cabe resaltar que la dosis establecida es solo para la exposición a productos de plásticos suaves como son mordederas, chupones y biberones no por otras fuentes de exposición.

1.1.1.2 Toxicocinética del DEHP

Las principales rutas de absorción del DEHP son la vía oral, inhalatoria y dérmica (Koop et al., 1999; ATSDR, 2002; ECB, 2006). Hay poca información disponible sobre la distribución del DEHP en seres humanos (ATSDR, 2012).

El metabolismo del DEHP se lleva a cabo de manera rápida y se inicia con una hidrólisis por acción de lipasas, produciendo el monoéster, monoetil-hexil ftalato (MEHP), el cual es más reactivo, además de la formación del 2-etil hexanol (2-EH); las enzimas que realizan este primer paso se han encontrado en la mucosa intestinal, hígado, riñón, piel, páncreas, tejido adiposo y pulmón; posterior a este primer paso, se puede seguir con una excreción parcial

del compuesto, ya sea del compuesto padre el DEHP o del metabolito MEHP en la orina y heces; sin embargo, tanto el MEHP como el 2-EH pueden sufrir reacciones subsecuentes de oxidación, dando paso a la formación de cetonas, además de tener reacciones de conjugación principalmente con el UDP- glucurónico (Fig. 2) (Albro, 1986; Silva et al., 2003; Frederiksen et al., 2007).

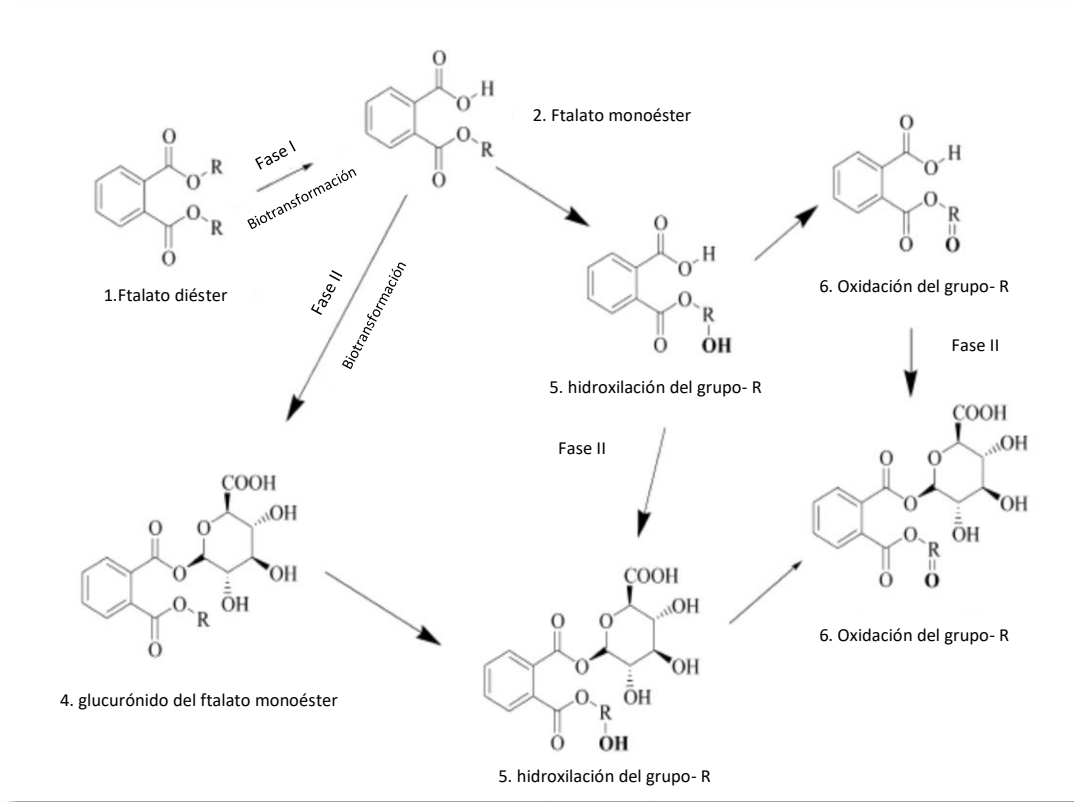


Figura 2. Vía metabólica general para los ftalatos.
(Modificada de Silva et al., 2003)

La vida media de eliminación del DEHP es menor a 24 h (Koch et al., 2005), siendo las principales vías de excreción la orina y las heces (ATSDR, 2012). Se considera que alrededor del 37-85% del DEHP es eliminado como metabolito en la orina, sin embargo, esta fracción varía en un amplio rango dependiendo de la especie (Ikeda, 1980; Silva et al., 2003; Koch et al., 2005).

1.1.1.3 Efectos tóxicos del DEHP

El DEHP ejerce una amplia gama de efectos negativos en la salud, los cuales dependen de la vía de exposición, entre ellos están: efectos neurológicos, reproductivos, genotóxicos, carcinogénicos, pulmonares, así como en el desarrollo de distintos órganos (ATSDR, 2012; EPA, 2017) (Tabla1).

1.1.2 Monoetil-hexil ftalato (MEHP)

El MEHP se obtiene de la hidrólisis del DEHP por acción de las lipasas, representa del 6-12% de los metabolitos y en modelos *in vitro* e *in vivo* se ha observado que este monoéster es muy activo y es el metabolito mayoritario del DEHP (Albro, 1986). Posteriormente, el MEHP continúa su biotransformación por distintas vías dependiendo de la especie; en primates, la glucuronidación es la primera fase de biotransformación del MEHP, mientras que en roedores es la oxidación (Fig. 2) (Tickner et al., 2001). Este metabolito puede ser directamente excretado en la orina o puede ser oxidado por el CYP450 4A, además de la acción por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), finalmente, por acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) se transforma a cetona para ser excretado (Albro et al., 1989; Ito et al, 2005).

1.1.2.1 Efectos tóxicos del MEHP

Al ser el metabolito mayoritario del DEHP y por su alta reactividad, los efectos relacionados con el DEHP también son atribuidos al MEHP. Se han observado efectos a nivel del desarrollo (efectos embriotóxicos y fetotóxicos) (Tabla 2). Además de esto, Oie et al. (1997) reportaron que un posible mecanismo de acción del MEHP sobre el aparato respiratorio puede ser por su capacidad de mimetizar la acción de las prostaglandinas, por su parecido estructural, por lo tanto, ejerce un efecto proinflamatorio y con esto da paso a un proceso de hiperreactividad e hipersensibilidad bronquial, lo que se asocia posteriormente a la presencia de asma.

Tabla 1: Efectos tóxicos del DEHP sobre el pulmón

Modelo	Hallazgo	Autores
Bebés prematuros de EUA expuestos a DEHP a través de tubos de PVC durante la terapia respiratoria.	<ul style="list-style-type: none">• Presentaron metabolitos del DEHP en orina.• Niveles de DEHP en el tejido pulmonar en necropsia de paciente que falleció posterior a la terapia pulmonar.• Síntomas similares a la enfermedad de la membrana hialina fueron observados en los pacientes.	Roth et al., 1988
Polvo en las casas de niños con síntomas de alergia (sibilancia, rinitis, eczema) de Sofía y Burgas en Bulgaria.	<ul style="list-style-type: none">• Concentraciones altas de DEHP con respecto a casas donde un hubo niños son síntomas (1.24 vs 0.86 mg/g polvo).• Relación dosis-respuesta entre la concentración del DEHP en el polvo de las casas y la severidad de la sibilancia en los niños participantes.	Kolarik et al., 2008
Ratas hembras alimentadas con alimento que contenía 1% de DEHP, durante la última semana de embarazo. Las crías fueron sacrificadas a los 2 días.	<ul style="list-style-type: none">• Disminución en el número de células del parénquima del espacio aéreo junto con un incremento en su tamaño.• Incremento en el número de neumocitos tipo II.	Magliozzi et al., 2003
Crías de ratas alimentadas con alimento que contenía 1% de DEHP (1g/kg de peso corporal/día) una semana antes del parto Sacrificio: 2, 7, 14 días	<ul style="list-style-type: none">• Disminución en el número de alvéolos, además de un agrandamiento de los mismos.• Disminución en la septación alveolar.• Aumento en la proliferación de las células epiteliales y mesenquimales.	Rosicarelli & Stefanini, 2009

1.2 Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT)

La EMT (por sus siglas en inglés) es un proceso biológico que permite que las células epiteliales sufran cambios bioquímicos que le permitan a la célula epitelial asumir un fenotipo mesenquimal y activarse para la capacidad de migración e invasión, y eleva la resistencia a la apoptosis, además, incrementa de manera significativa la producción de componentes de la matriz extracelular. La EMT incluye la activación de factores de transcripción, expresión de proteínas de superficie celular (Fig. 3), la reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto y la producción de enzimas que degradan a la matriz extracelular (ECM).

Tabla 2: Efectos tóxicos del MEHP

Modelo	Hallazgo	Autores
Modelos <i>in vivo e in vitro</i> en células de Sertoli	<ul style="list-style-type: none"> • Induce aberraciones cromosómicas 	Kirby et al., 1983; Tomita et al., 1982, 1988
Ratones y ratas	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos sobre el sistema reproductivo masculino (criptorquidea) y femenino (sobre células de la granulosa) 	Ichburg & Boekelheide, 1996; Dalgaard et al., 2001; Reinsberg et al., 2009
Modelos <i>in vivo</i> en células de la granulosa	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución en el mRNA y la proteína de la enzima aromatasa 	Lovekamp-Swan & Davis, 2003

La EMT puede ser clasificada en 3 tipos, la EMT tipo 1 corresponde a la transición que se presenta principalmente en la embriogénesis y el desarrollo de órganos, durante la embriogénesis y el desarrollo de órganos las células de epitelios parecen tener cierta plasticidad lo que les permite cambiar entre estadios epiteliales y mesenquimales vía procesos de EMT. La EMT tipo 2 es considerada la transición asociada a evento de regeneración tisular, así como de fibrosis en órganos como riñones, hígado, pulmón e intestino. En un proceso inflamatorio se lleva cabo la liberación de citocinas y señales inflamatorias, lo que produce un cambio en las células como la expresión de proteínas tales como el colágeno, laminina, elastina y tenascina. También se dan cambios en la expresión de factores de crecimiento, lo que es considerado como un evento relevante y precede a la formación de fibroblasto, además de observarse un incremento en fibronectina y una disminución en E-cadherina. Esto permite el desplazamiento celular hasta el lugar del daño, lo que sugiere que dicha transición puede ser considerado un evento precursor a la regeneración del tejido y en caso de un daño continuo puede dar lugar a un evento fibrótico. Finalmente, la EMT tipo 3 está asociada con la progresión del cáncer y metástasis, los mecanismos bioquímicos en dichos eventos que permiten un fenotipo invasivo a las células para posteriormente darse la diseminación de un cáncer están vinculados a la activación de una EMT, en donde marcadores tales como α -SMA (*Smooth muscle actine*), vimentina y desmina se han visto expresadas en células de carcinomas (Kalluri & Neilson, 2003; Kalluri & Weinberg, 2009).

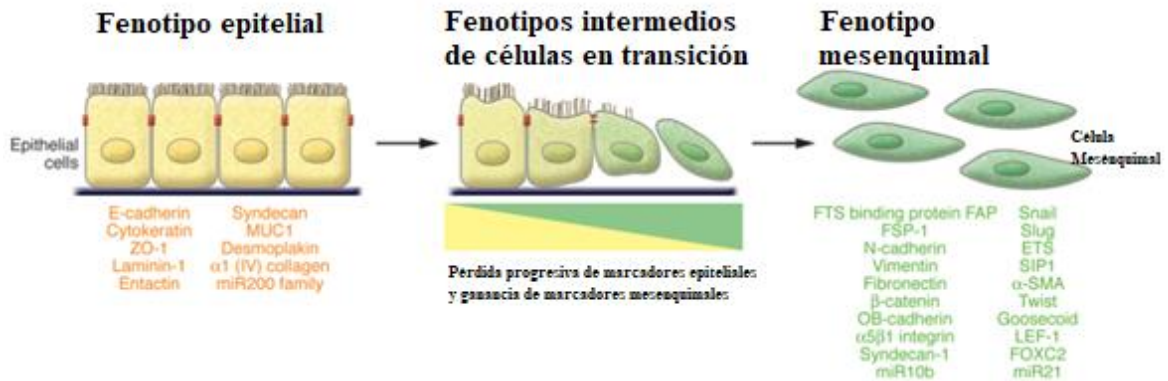


Figura 3. Expresión de proteínas en una transición epitelio mesénquima (EMT).
(Tomado de Kalluri & Weinberg, 2009)

1.3 Desarrollo y maduración pulmonar

El desarrollo pulmonar inicia durante la 4a semana de gestación del endodermo del intestino primitivo. Las etapas del desarrollo prenatal en el pulmón son: pseudoglandular, canalicular, sacular y alveolar (Fig. 4); La etapa alveolar es de suma importancia, debido a que refiere a una etapa que sucede en estadio prenatal y postnatal que incluye el crecimiento en número y en tamaño de los alvéolos, los principales encargados del intercambio gaseoso en el pulmón. Se considera que el pulmón es diferente entre un recién nacido y un adulto, debido a que la formación de los alvéolos se continua hasta los 2 años después del nacimiento, y hasta el final de la adolescencia aproximadamente a los 18 años se da un aumento en el tamaño de los alvéolos (Miller & Marty, 2010). De esta manera, la maduración alveolar representa una ventana de susceptibilidad hacia contaminantes ambientales.

La maduración de la capacidad del intercambio de gases es un proceso que se lleva a cabo durante la alveologénesis (desarrollo de los alvéolos), la cual puede verse afectada por la exposición a factores ambientales como los contaminantes en el aire.

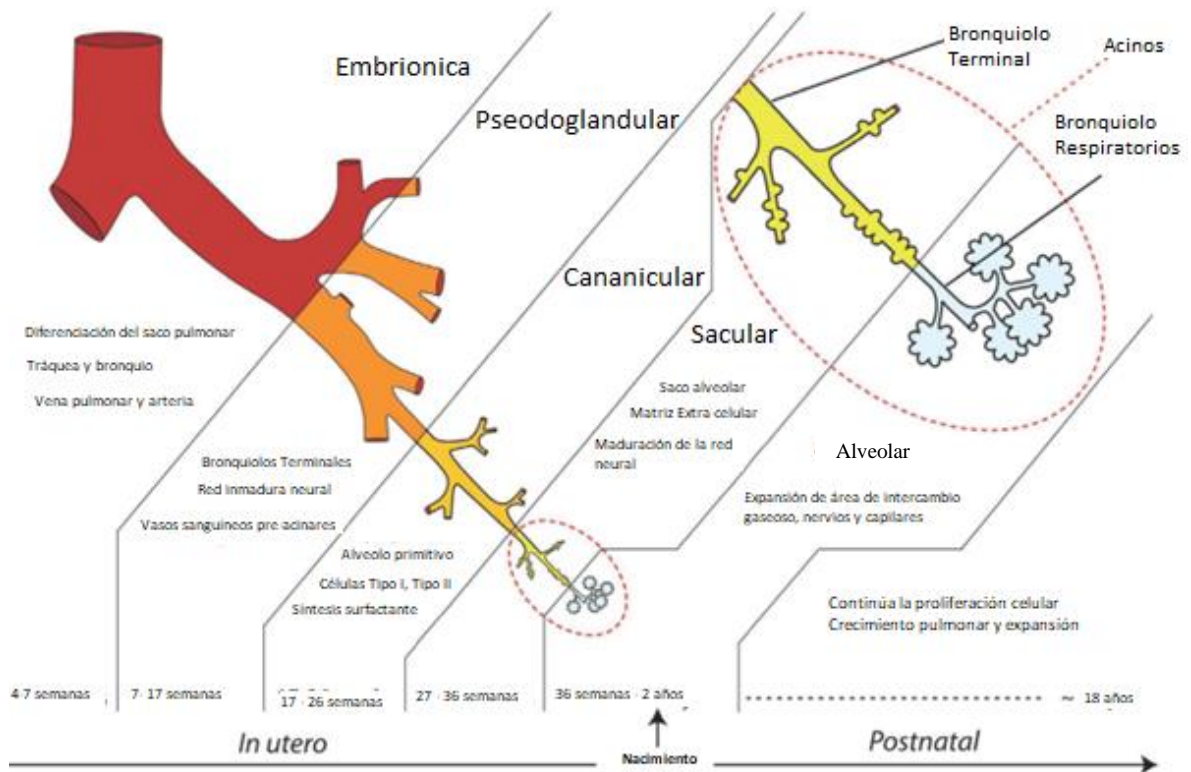


Figura 4. Estadios principales del desarrollo pulmonar en el ser humano.
(Tomado de Miller & Marty, 2010).

El proceso de alveologénesis y maduración de las células pulmonares es altamente regulado por distintos factores y componentes, por ejemplo: el ácido retinoico (RA, por sus siglas en inglés), el factor derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés) contribuyen a la regulación de la elongación de la cresta secundaria; así mismo el factor de transcripción y receptor activador de peroxisomas gamma (PPAR γ , por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento transformante (TGF β , por sus siglas en inglés) son fundamentales en la regulación de la elongación en la cresta secundaria, además de tener una participación en la etapa de alveolarización. Una regulación anormal de este proceso puede resultar en enfermedades como la hipoplasia de la superficie del epitelio alveolar, lo que resulta en una deficiencia en el transporte de gas (Shi et al., 2007). En este paso, los dos tipos celulares más importantes del alvéolo son los neumocitos tipo I y tipo II. Los cuáles pueden verse afectados por los

factores antes mencionados. Las características de los neumocitos y los factores de crecimiento se comentarán más adelante.

1.3.1 Neumocitos tipo I

Las células alveolares tipo I cubren alrededor de 90% de la superficie alveolar, por lo que el daño por la exposición a contaminantes en el aire ocurre preferentemente en estas células, debido a que se encuentran en mayor proporción (Selman & Pardo, 2006).

1.3.2 Neumocitos tipo II

Además, el neumocito tipo II secreta una sustancia tensoactiva conocida como surfactante, que evita el colapso del alveolo y que puede mediar la respuesta inflamatoria en el alveolo (Beers & Fisher, 1992; Kalina et al., 1992; Beers & Lomax, 1995; Selman & Pardo, 2006). Por otra parte, los neumocitos están implicados en la reparación del epitelio alveolar, debido a que son capaces de censar el daño en el epitelio tipo I y en respuesta tienen la capacidad de des-diferenciarse o reprogramarse, este procedimiento se lleva a cabo a partir de un proceso biológico mencionado anteriormente que es la EMT. Estos neumocitos también tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento, los cuales pueden fungir como mensajeros autocrinos para dichas células, entre los principales factores de crecimiento se encuentran: el factor de crecimiento epidermal (EGF), PDGF, distintas isoformas de TGF y factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Fehrenbach, 2001). En modelos *in vitro*, el tipo de células más utilizadas son las células A549, pertenecientes a un modelo de adenocarcinoma pulmonar humano que tiene las características morfológicas y bioquímicas de los neumocitos tipo II. Además, presentan propiedades metabólicas, secretorias (entre ellas el surfactante) y de transporte características del epitelio alveolar (Foster et al., 1998).

1.3.3 Surfactante

El epitelio alveolar sintetiza una capa de una compleja mezcla de lípidos y proteínas conocida como surfactante, esta capa se encarga de disminuir la tensión de la superficie alveolar. Específicamente, el epitelio alveolar tipo II (neumocitos tipo II) es el encargado de sintetizar, secretar y reciclar los componentes del surfactante. El surfactante está compuesto 90% de lípidos (aproximadamente del 80-90% de fosfolípidos) y alrededor del 10% de proteínas (Beers et al., 1998). Los componentes lipídicos son cadenas de ácidos grasos saturados del

cuál predomina el dipalmitoilfosfatidilcolina, el cual contribuye substancialmente a las propiedades del surfactante en el pulmón. La fracción proteica comprende una gran cantidad de proteínas séricas del 50-90% y 4 apoproteínas asociadas entre ellas que son importantes en las funciones específicas del surfactante. El surfactante tiene la función de evitar el colapso de los alvéolos (anti-pegamento), regula la tensión superficial en los alvéolos en relación con el tamaño de estos, lo cual es importante para llevar a cabo una eficiente ventilación y estabilizar de esta manera a los alveolos; la ausencia, así como la inactivación del surfactante dan como resultado el colapso alveolar al momento del proceso de espiración. Las proteínas del surfactante han sido denominadas como SP-A, SP-B, SP -C y SP-D, y son consideradas como marcadores de susceptibilidad a enfermedades obstructivas crónicas, síndrome de dificultad respiratoria aguda y proteinosis alveolar. La SP-A, SP-B y SP-D han sido detectados fueran del pulmón, mientras que la SP-C se considera exclusiva de las células alveolares tipo II (Rooney et al., 1994; Gobran & Rooney, 2001). Una disminución en la secreción de surfactante está asociada a enfermedades respiratorias en niños y adultos, como son el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) o síndrome de membrana hialina, enfermedad que se ha observado en niños prematuros y que a su vez se relaciona con una disminución en la maduración pulmonar (Abman, 2001), y en el caso de los adultos se ha relacionado con una acumulación de plaquetas y leucocitos activados en el espacio aéreo, que liberan prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) e interleucinas, las cuales lesionan a la célula, facilitan la inflamación y la fibrosis (Selman & Pardo, 2006). El uso de surfactante exógeno como tratamiento para el manejo del SDRA en niños prematuros es utilizado como tratamiento de primera línea para evitar los efectos de daño al pulmón, principalmente en la ventilación mecánica (Hartl & Griese, 2006; Köning & Guy, 2013).

1.3.4 Factores y componentes de la homeostasis alveolar

1.3.4.1 Factor derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF es un factor importante en distintos eventos en el pulmón a lo largo de la vida, por ejemplo, en el desarrollo se encuentra en distintos tipos de células, en un modelo de ratón *knockout* se observó que la ausencia del gen PDGF-A se asociaba con el desarrollo de enfisema pulmonar (Boström et al., 1996), de igual manera, la delección del gen se relaciona con una pérdida en las células de músculo liso lo que coincide con una ausencia de depósitos de elastina y una falla en la formación de septos en el alveolo (Lindahl et al., 1997). Una

alteración en los niveles proteicos de este factor de crecimiento también está vinculada a procesos fibróticos (Kalluri & Neilson, 2003; Willis & Borok, 2007; Wu et al., 2013). Además, el PDGF y su receptor regulan el sistema de proliferación de las células mesenquimales, además de ser un quimioatrayente, eventos implicados en la génesis de una gran variedad de enfermedades pulmonares que incluyen fibrosis pulmonar, asma y cáncer pulmonar (Bonner et al., 1998; Bonner, 2004).

1.3.4.2 Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

El FGF pertenece a la familia de los receptores tirosina-cinasas (RTKs, por sus siglas en inglés) son mediadores de la respuesta extracelular para la diferenciación, proliferación y supervivencia celular. La señalización de FGF también es fundamental para la alveogénesis y una señal hipomórfica (pérdida de función) o ectópica del FGF resulta en una displasia alveolar letal en el neonato, de igual manera, una mutación nula para el factor de crecimiento de fibroblastos 10 y 2b (Fgfr10 y Fgfr2b, por sus siglas en inglés) tiene un efecto sobre las ramificaciones distales y una normal diferenciación del epitelio pulmonar (Peters et al., 1994; Park et al., 1998; Warburton et al., 2005). Un regulador negativo para la vía de FGF es el gen *sprouty* (*Spry*), el cual impide su señalización, y por lo tanto los efectos causados por este factor de crecimiento (Gross et al., 2001).

1.3.4.3 Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)

La interacción entre las vías aéreas y los vasos sanguíneos es crucial durante el desarrollo del pulmón. Uno de los mayores factores en el desarrollo vascular del pulmón es el VEGF; Kasahara et al. (2000) observaron que al inhibir el receptor de VEGF se inducía apoptosis celular del septo alveolar, lo que se interpreta como una disminución en la superficie del intercambio gaseoso. Por otra parte, Ema et al. (1997) observaron que la expresión del mRNA del *VEGF* se da de manera marcada en el pulmón en la etapa fetal tardía, y con experimentos de hibridación *in situ* se observó la expresión de este mensajero en las células del epitelio alveolar, concluyendo que el gen *VEGF* está involucrado en la morfogénesis tubular del pulmón y de los vasos sanguíneos. Por otra parte, Compennolle et al. en el 2002 observaron que el VEGF es capaz de estimular la producción de la proteína del surfactante en cultivo de neumocitos tipo II, y en un modelo *in vivo*, la instilación de VEGF estimulaba la conversión de glucógeno a surfactante, lo que protegía a ratones prematuros contra el SDRA, enfermedad

relacionada con una disminución en la secreción del surfactante y colapso de los alvéolos. Janér et al. (2007) reportaron que neonatos prematuros que fallecieron por SDRA presentaban niveles menores de *VEGF* en el pulmón en comparación con los niveles de los neonatos prematuros sobrevivientes. Adicionalmente al desarrollo, el VEGF es un factor relevante en la presencia de algunas enfermedades, entre ellas el cáncer, debido a que se ha observado que promueve la angiogénesis tumoral, además de presentarse en mayor cantidad en regiones fibróticas del pulmón de rata (Fehrenbach et al., 1999; Hanahan & Weinberg, 2000).

Los factores anteriores también se han descrito en distintos eventos como la EMT, la cual es importante en el desarrollo pulmonar, así como en el desarrollo de distintas enfermedades como pueden ser procesos fibróticos y cáncer de pulmón.

1.4 Efectos del DEHP y MEHP sobre la EMT

Existe poca o casi nula información acerca de los efectos que los ftalatos pueden tener sobre la EMT. De los reportados, Chen et al. (2018) observaron que el DEHP y su metabolito MEHP son capaces de inducir la EMT en células HCT116 (células de cáncer de colon) expuestas a 10 μ M de DEHP o MEHP, observando que ambos ftalatos disminuyen los niveles proteicos de E-cadherina e incrementaron los niveles de N-cadherina, vimentina y α -SMA. Por otra parte, Wu et al. (2018) también reportan un efecto similar en células NRK-52E (células de túbulo renal) expuestas a 25 μ M de DEHP durante 72 h; los autores observaron una disminución en los niveles de E-cadherina y un incremento en vimentina y fibronectina. A pesar de la carencia de estudios acerca del tema, los estudios demuestran que el DEHP y MEHP tienen la capacidad de inducir y alterar proteínas implicadas en la EMT.

1.5 Justificación

Los ftalatos son compuestos químicos ubicuos considerados actualmente como contaminantes emergentes relevantes en salud pública. Dichos ftalatos pueden ser liberados al ambiente (aire) con facilidad debido a que no se encuentran unidos covalentemente al polímero plástico que los contiene y por lo tanto, pueden ingresar por vía inhalatoria al organismo. El ftalato más utilizado es el DEHP el cuál representaba el 95% de los ftalatos más utilizados a nivel mundial. El DEHP es metabolizados por las enzimas esterases en distintos metabolitos, siendo el más importante por proporción y toxicidad el MEHP, al cual

se le atribuye la mayor parte de los efectos tóxicos reportados para el DEHP. Por otra parte, el DEHP y MEHP pueden inducir alteraciones de varios componentes, entre ellos los factores de crecimiento. Adicionalmente, existen reportes que indican que el DEHP y su metabolito MEHP podrían inducir la EMT, evento importante en distintos estadios de la vida entre ellos el desarrollo embrionario y la resolución de procesos inflamatorios, además de estar implicada en procesos tumorigénicos y fibróticos. Los neumocitos tipo II son las células alveolares más relevantes, debido a sus distintas funciones entre las que destacan la secreción del surfactante, regulación del sistema inflamatorio en el alveolo, además están implicados en la reparación del daño a nivel alveolar. Un daño sobre los neumocitos tipo II podría incrementar la probabilidad de padecer una enfermedad pulmonar. Por lo tanto, es de nuestro interés conocer los efectos que los ftalatos DEHP y MEHP tienen sobre la proliferación, migración celular, diferenciación y pérdida de la polaridad celular (EMT) en células A549, además de evaluar un posible mecanismo de acción mediante la participación de los factores de crecimiento implicados en el desarrollo y enfermedades pulmonares.

1.6 Hipótesis

El DEHP y MEHP incrementarán la proliferación y la migración de las células A549, además de disminuir marcadores epiteliales e incrementar factores de crecimiento en las mismas.

1.7 Objetivo general

Evaluar el efecto del DEHP y MEHP sobre la proliferación y maduración celular, marcadores epiteliales y expresión de factores de crecimiento en células A549.

1.8 Objetivos particulares

1. Determinar la curva de toxicidad del DEHP y MEHP sobre las células A549.
2. Evaluar la proliferación de las células A549 expuestas a los ftalatos.
3. Evaluar la capacidad de migración de las células A549 expuestas al DEHP y MEHP.
4. Evaluar el efecto sobre marcadores epiteliales y mesenquimales de neumocitos tipo II en las células A549 expuestas a los ftalatos.
5. Evaluar el efecto de los ftalatos sobre los niveles de RNA mensajero de *VEGF*, *Spry* y *PDGF*.

2. Métodos

2.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular A549 derivada de un adenocarcinoma pulmonar humano que tiene las características morfológicas y bioquímicas de células alveolares tipo II (neumocitos o epitelio alveolar tipo II). Adicionalmente, se ha descrito la generación de la EMT en este modelo celular (Kim et al, 2007).

La estrategia experimental se muestra en la figura 5. Las células A549 se mantuvieron en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), al momento de la exposición los niveles de SFB se disminuyeron a 0.5% y el medio se suplementó con 1% (10,000 U/ml) de penicilina-estreptomina, 1% de antimicótico (100 X), 1% L-glutamina, a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂ y ambiente húmedo.

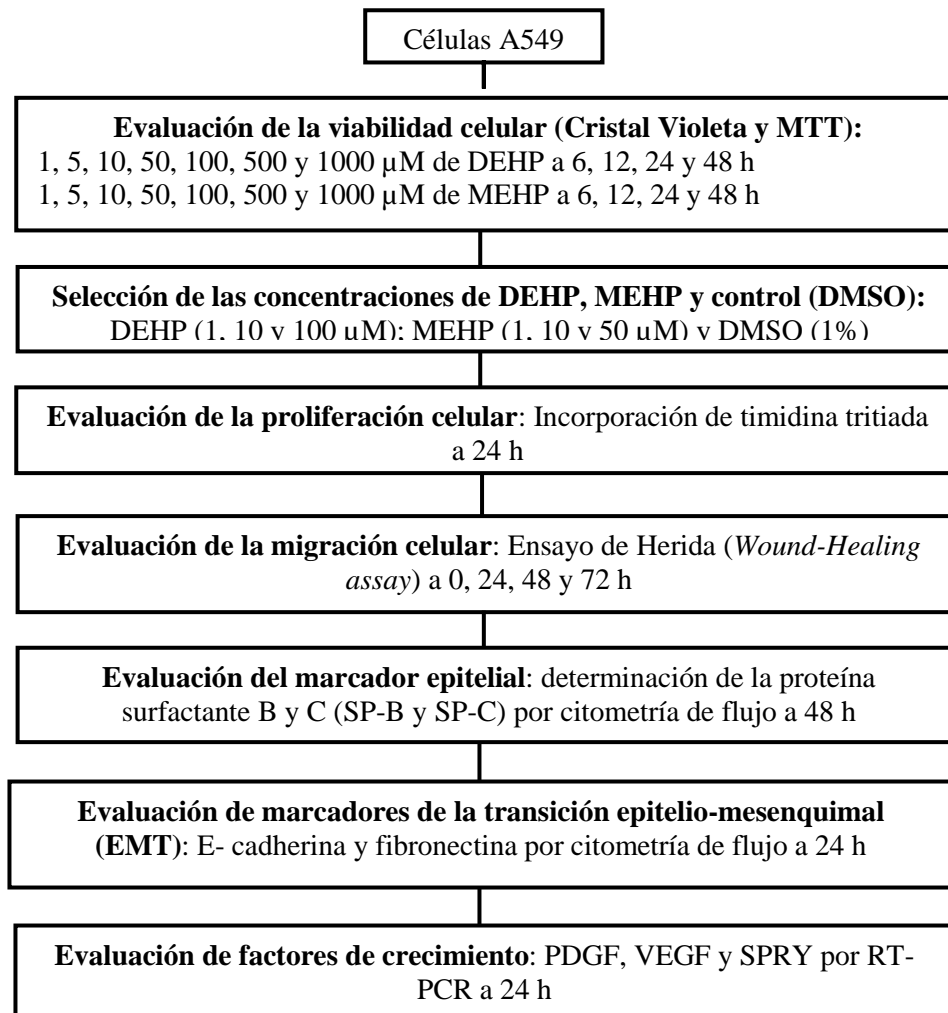


Figura 5. Diagrama de flujo: Exposición al DEHP y MEHP en células A549.

2.2. Determinación de la viabilidad: cristal violeta y MTT

La determinación de la viabilidad o citotoxicidad se llevó a cabo mediante dos técnicas colorimétricas, esto para confirmar el efecto citotóxico causado por el DEHP y MEHP.

2.2.1. Citotoxicidad evaluada por el cristal violeta

2.2.1.1 Principio

El cristal violeta es un colorante capaz de unirse e intercalarse en el ADN y proteínas. Su uso para evaluar la viabilidad celular se debe a que algunas células requieren estar adheridas para su supervivencia, por lo tanto, durante su muerte dichas células pierden esta capacidad. El cristal violeta forma complejos con las células adheridas tiñendo su ADN y proteínas, y así, de manera indirecta se cuantifica la muerte celular; las células muertas (células no adherentes) reducirán la cantidad de cristal violeta en el cultivo (Feoktistova et al., 2016)

2.2.1.2 Procedimiento

Se sembró una densidad de 5×10^4 células en placas para cultivo de 12 pozos por triplicado, después de la siembra y transcurridas 24 h se procedió a realizar la exposición con DMSO (1%), DEHP a concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM , o MEHP a 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM , y se dejaron incubar por un período de 6, 12, 24 y 48 h. Posterior al tiempo de incubación se realizaron 2 lavados con PBS y las células se fijaron con 250 μl de formaldehído al 5% durante 10 min, pasado este tiempo, el formaldehído fue removido, se agregaron 250 μl de cristal violeta (0.1%) y se dejó incubar durante 20 min, para después lavar las células 4 veces de manera gentil, evitando desprender las células fijadas y eliminando el exceso del colorante. Finalmente se agregó 1 ml de ácido acético glacial (33%) y se mezcló el contenido del pozo, se homogeneizó con una pipeta, para posteriormente llevarlo al lector de placas de Elisa y cuantificar la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. La citotoxicidad se expresó en porcentaje de células viables comparadas con el control.

2.2.2 Citotoxicidad por el método de MTT

El MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de las células para convertir el MTT, sal de tetrazolio soluble en agua, en un compuesto insoluble e impermeable a la membrana celular. La

reducción del MTT se lleva a cabo dentro de la mitocondria por acción de la enzima succinato deshidrogenasa. Así, esta técnica evalúa la actividad mitocondrial de la célula. Una actividad mitocondrial disminuida está relacionada con una disminución en la viabilidad celular (Fotakis & Timbrell, 2006).

2.2.2.1 Procedimiento

Se sembró una densidad de 5×10^4 células en placas para cultivo de 96 pozos por triplicado, a las 24 h se realizó la exposición con DMSO (1%), DEHP a las concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM o MEHP a 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM y se dejaron incubar por 6, 12, 24 y 48 h. Cuatro horas antes de finalizar la exposición se agregaron 20 μl de MTT (0.5 mg/ml) y se dejó terminar el tiempo de la exposición. Posteriormente se removió el medio cuidando de no tomar los cristales y se agregó 1 ml de alcohol isopropílico para disolver los cristales de formazán producidos. Finalmente se cuantificó la presencia de los cristales disueltos en un lector de ELISA a 570 nm. La actividad mitocondrial se reportó como el porcentaje de la actividad mitocondrial respecto al control.

2.3. Análisis de la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada

2.3.1 Principio

Para determinar la tasa de proliferación celular en respuesta al tratamiento con DEHP y MEHP se empleó la técnica de incorporación de timidina tritiada $^3\text{[H]T}$. Esta técnica se basa en la determinación de la síntesis de ADN por la incorporación de timidina marcada radioactivamente con tritio (^3H). El tritio es posteriormente cuantificado por un detector de centelleo como cuentas por minuto (cpm) (Bond et al., 1959).

2.3.2 Procedimiento

Después de la evaluación de la citotoxicidad se seleccionaron 3 concentraciones para cada uno de los ftalatos, en el caso del DEHP se seleccionaron las concentraciones de 1, 10 y 100 μM y para el MEHP se seleccionaron las concentraciones de 1, 10 y 50 μM . Se sembró una densidad de 5×10^4 células en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano y se expusieron a las concentraciones de DEHP y MEHP mencionadas, así como con el control con DMSO durante 24 y 48 h. Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado. Doce horas antes de la cosecha se adicionó un pulso de timidina ([metil- ^3H] timidina, 1 μCi por pozo).

Se eliminó el medio (en desechos especiales), se realizó un lavado con 150 µl de PBS (1 X) y se agregaron 100 µl de tripsina para desprender a las células. Finalmente se realizó la cosecha en filtros de fibra de vidrio y se cuantificó la incorporación de timidina como cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo. La tasa de proliferación de cada tratamiento fue calculada como porcentaje del control.

2.4 Evaluación de la migración celular mediante el ensayo de herida (*Wound-Healing assay*)

2.4.1 Principio

El ensayo de la herida imita la migración celular que se lleva a cabo durante la reparación de una herida en un modelo *in vivo*. El paso básico en este ensayo es la creación de una “herida” en la monocapa celular y la posterior toma de imágenes en el microscopio al tiempo cero (comienzo del ensayo) y a intervalos de tiempo durante la migración y cierre de la herida (Rodriguez et al., 2005)

2.4.2 Procedimiento

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 9×10^5 células por triplicado, y posterior a las 24 h se realizó una rasgadura o “herida” en la parte media del pozo con una punta de 200 µl ayudándose de un portaobjetos (para que la rasgadura fuera lo más recta posible), la herida se realizó gentilmente de manera que no quedó la recta marcada en el pozo y solo se levantaron las células. Adicionalmente a la herida se realizaron 2 lavados con PBS (1X) agitando suavemente el pozo para eliminar las células desprendidas. Posteriormente se realizaron las exposiciones a DMSO (1%), DEHP (1, 10 y 100 µM) o MEHP (1, 10 y 50 µM), todos en co-tratamiento con Mitomicina C (inhibidor de la proliferación). Cada 24 h, los pozos fueron lavados con PBS y se renovó el medio. Se tuvo un control positivo de migración utilizando el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés, 50 ng/ml). Para la evaluación de la migración, los pozos fueron monitoreados y fotografiados con una cámara digital montada en un microscopio invertido (Olympus CKX41) a las 0, 24, 48 y 72 h. Finalmente se calculó el área de la herida mediante el programa Image J que se encuentra libre en la página de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos. Se calculó el área sin células dentro de la herida y se reportó como el porcentaje de la apertura inicial de la herida.

2.5 Análisis de las proteínas surfactantes SP-C y SP-B, así como E-cadherina, fibronectina y α -SMA mediante citometría de flujo

2.5.1 Principio

La citometría de flujo es un método analítico cuantitativo que permite la determinación de múltiples características celulares. Se puede realizar la cuantificación de parámetros celulares tales como: tamaño, forma y complejidad. Adicionalmente, el uso de una fuente de luz permite excitar al fluorocromo previamente utilizado para marcar a las proteínas, y de esta manera se determina la presencia y cantidad de la proteína producida por las células. Las señales luminosas producidas y detectadas se transforman en impulsos eléctricos que son convertidos en señales digitales procesadas por la computadora

2.5.3 Procedimiento

Las células fueron sembradas a una densidad de 50,000 cel/cm² en placas de Petri (P-100), y a las 24 h se realizó la exposición con DMSO (1% v/v), DEHP (1, 10 y 100 μ M) o MEHP (1, 10 y 50 μ M) durante 48 h con la renovación del medio cada 24 h. Posterior al tiempo de exposición, las células fueron cosechadas mediante raspado, se realizaron 2 lavados con PBS-FACs (solución PBS + Azida de sodio + SFB, fría a 4 °C) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. Posterior a los lavados se realizó la cuantificación de las células con azul de tripano para colocar en cada tubo 1X10⁶ células, y se procedió a realizar la tinción intracelular para las proteínas del surfactante SP-B y SP-C y la tinción extracelular para las demás proteínas.

2.5.2.1 Tinción extracelular

Se agregaron 250 μ l de PBS-FACs al 15% con 15% de SFB a los 32 tubos eppendorf con 1X10⁶ células para bloquearlas durante 20 min en hielo. Posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm a 4 °C, se obtuvo el botón de células, se decantó el sobrenadante y se procedió a realizar las tinciones. Se realizaron dos tinciones por cada experimento. Las tinciones se realizaron de la siguiente manera: en las muestras expuestas al control (DMSO), DEHP o MEHP se realizó el acople de 2 anticuerpos diferentes (1er anticuerpo y 2do anticuerpo primario), adicionalmente se utilizaron 4 controles (control negativo de tinción, control positivo para el 1er anticuerpo, control positivo para el 2do anticuerpo y control positivo para ambos anticuerpos). Posterior al bloqueo de las células se colocaron 100 μ l del

1er anticuerpo (ver dilución en la tabla 3) y se incubaron durante 30 min a 4 °C en completa oscuridad, después se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4 °C, se decantaron y se realizó un lavado con la solución de PBS-FACs, y se centrifugó de nuevo a 1500 rpm. Se agregó el anticuerpo secundario correspondiente para cada anticuerpo primario (ver tabla 3) y se dejó incubar durante 20 min a 4 °C en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se lavaron con 1 ml de PBS-FACs, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4 °C y se procedió a repetir el procedimiento con el 2do anticuerpo (SMA-FITC). Finalmente se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS-FACs y las células se fijaron con formaldehído hasta su evaluación. Se analizaron 50,000 eventos en el citómetro de flujo FACSCalibur. Los datos obtenidos en el citómetro de flujo se evaluaron empleando el Flowing software ver 2.5.

Tabla 3: Anticuerpos empleados en la cuantificación de proteínas

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN
Monoclonal α -SMA-FITC (ratón: IgG2a) Clona 1A4	1:500	-	
[¥] Monoclonal Anti-E-cadherina (ratón) (IgG1)	1:200	Policlonal Cy5 cabra-anti ratón/IgG	1:600
[¥] Monoclonal fibronectina (ratón: IgG1) Clona IST-2	1:50	Policlonal Cy5	1:400
[§] Policlonal SP-C (conejo) (IgG)	1:50	Policlonal Cy3- cabra-anti conejo / IgG (H+L)	1:400
[§] Monoclonal SP-B (ratón) (IgG2b)	1:50	Policlonal Cy5	1:600

[¥] Se diluyó en el PBS-FACs

[§] Se diluyeron en la solución de lavado *buffer BD Perm/wash*

2.5.2.2 Tinción intracelular

A 1×10^6 de células se agregaron 250 μ l de la solución *BD Cytofix/Cytoperm* y se incubó durante 20 min a 4 °C (se evita la agregación celular mediante agitación en vórtex). Pasado el tiempo se realizaron 2 lavados con la solución de lavado (*buffer BD Perm/wash*) a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. Posteriormente se realizó el bloqueo a 1×10^6 células agregando 250 μ l de *buffer BD Perm/wash* con 15% de SFB, durante 20 min en hielo. Después se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, se obtuvo el botón de células, el sobrenadante se decantó y se procedió a realizar las tinciones de la siguiente manera: se

colocaron 100 μ l del 1er anticuerpo (SP-B; ver dilución en la tabla 3) y se incubó durante 30 min a 4°C en completa oscuridad, pasado este tiempo se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4 °C, se decantó y se realizó un lavado con la solución *buffer BD Perm/wash* y se centrifugó a 1500 rpm. Se agregó el anticuerpo secundario correspondiente para SP-B (ver tabla 3) y se dejó incubar durante 20 min a 4 °C en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se lavó con 1 ml de *buffer BD Perm/wash* a 1500 rpm, 5 min a 4 °C y se procedió a realizar la doble tinción con el SP-C siguiendo nuevamente el procedimiento de tinción descrito para SP-B, el cual consta de los siguientes pasos: agregar el anticuerpo primario para SP-C, incubar, lavar y agregar el anticuerpo secundario. Finalmente se realizaron 2 lavados con 1 ml de *buffer BD Perm/wash* y se fijaron las células con formaldehído hasta su evaluación. Se tuvieron 4 controles: control negativo de tinción, control positivo para SP-B, control positivo para SP-C, control positivo para ambos. Se analizaron 50,000 eventos en un citómetro de flujo FACSCalibur. La información obtenida se evaluó empleando el Flowing Software ver 2.5.

2.6 Cuantificación del mRNA de los receptores de los factores de crecimiento *VEGF*, *PDGF* y *Spry*

2.6.1 Principio

Se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) (Barlett & Stirling, 2003). Esta técnica se utiliza para amplificar enzimáticamente una región específica del ADN, mediante el empleo de cebadores específicos complementarios a dicha secuencia. En la RT-PCR, la cadena molde es comprendida por una hebra de RNA que es retro transcrita en ADN complementario (cDNA) utilizando la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente, el fragmento se amplifica por PCR en tiempo real.

2.6.2 Procedimiento

2.6.2.1 Extracción del RNA

El RNA de las células se obtuvo mediante el método de Trizol. Se sembraron las células a una densidad de 50,000 cel/cm² en placas P-100 y se realizó la exposición a DMSO (1% v/v), DEHP (1, 10 y 100 μ M) o MEHP (1, 10 y 50 μ M) durante 24 h. Posterior a la exposición, las células fueron lavadas con PBS 1X y se les agregó 1 ml de Trizol frío y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar durante 5 min en hielo, para después centrifugar a 16,000 rpm

durante 20 min a 4 °C. Posterior a la separación de 3 fases se transfirió la parte acuosa (aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes) a un tubo estéril, se agregó 0.7 vol de isopropanol frío y se dejó precipitar durante toda la noche a -20 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 16,000 rpm a 4 °C durante 40 min, se retiró el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 1 ml de etanol frío al 70%, con centrifugación durante 5 min a 4 °C. Finalmente se dejó secar por 10-15 min en una campana con hielo (la mancha blanca se cambia a transparente) y el RNA se suspendió en 20 μ l de agua estéril (inyectable). La integridad del RNA se verificó en geles de acrilamida al 1%, la concentración y pureza del material extraído se realizó en un Nanodrop (260/280 = 2.0- 2.2), se hicieron alícuotas y se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

2.6.2.2 Obtención del cDNA

La síntesis del cDNA se realizó a partir de 5 μ g de RNA total mediante un kit comercial. Se siguieron las instrucciones del comerciante.

2.6.2.3 Amplificación de los genes *PDGF*, *VEGF* y *Spry*

El cDNA obtenido se cuantificó y se sometió a múltiples amplificaciones mediante PCR, con las sondas TAQMAN® para cada uno de los genes (tabla 4), utilizando el kit para las mismas sondas. Se siguieron las instrucciones del comerciante. Se utilizó el gen endógeno hHPRT. Los niveles se representaron como el $\Delta\Delta$ Ct.

Tabla 4. Sondas TAQMAN para los receptores de los factores de crecimiento.

Sonda	Marcador	Catálogo #
hHPRT1	VIC-MGB	Hs02800695_m1
PDGF-A	FAM-MGB	Hs00964426_m1
VEGF A	FAM-MGB	Hs00900055_m1
Spry	FAM-MGB	Hs01083036_s1

2.7 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar (E.E) o media \pm desviación estándar (D.E). Se realizaron las pruebas de acuerdo a la distribución de los datos: ANOVA de una o dos vías para datos con distribución normal y una prueba *post hoc* de Bonferroni o

U-Mann Whitney y Kruskal-Wallis con la prueba *post hoc* de Dunn para datos con distribución no normal. Se realizaron pruebas de correlación y tendencia. Se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 para su análisis. Se tomó como diferencia significativa un valor de $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Viabilidad celular

3.1.1 Citotoxicidad del DEHP y MEHP por la técnica del cristal violeta

En la figura 6 se presenta el porcentaje de células viables a las distintas concentraciones de DEHP (1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM) a las 6, 12, 24 y 48 h. No se observó una diferencia significativa en el porcentaje de células viables a las concentraciones evaluadas con respecto al tiempo.

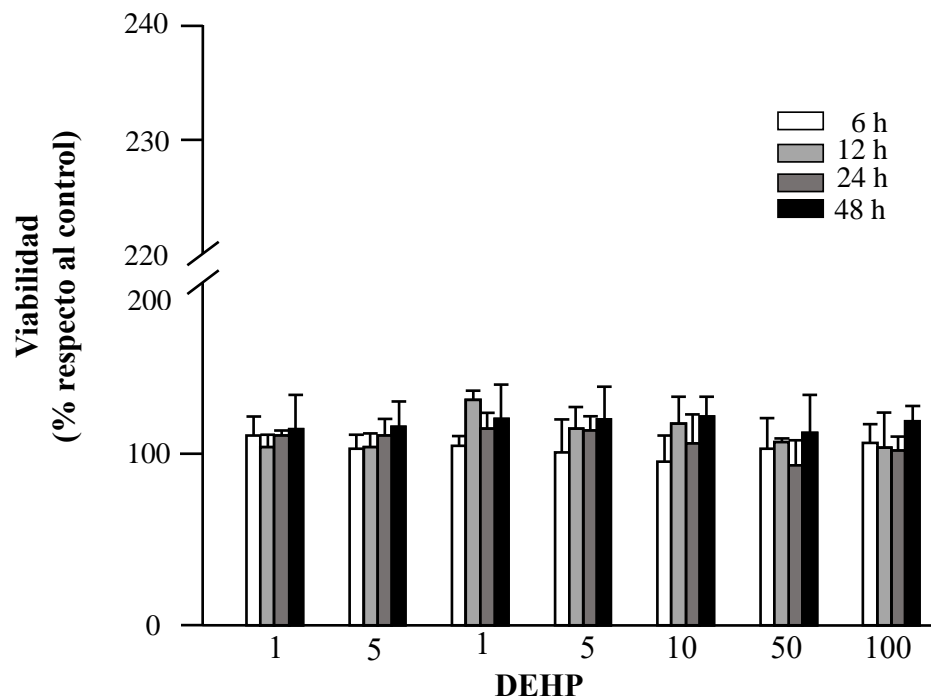


Figura 6. Viabilidad celular después de la exposición al DEHP. Células A549 a una densidad de 50,000 cel/cm² fueron incubadas con 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM de DEHP por 6, 12, 24 y 48. Se presenta la media \pm EE de 3 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas. U- Mann Whitney. $p > 0.05$.

En la figura 7 se presenta el porcentaje de células viables por la exposición a las distintas concentraciones de MEHP (1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM) a las 6, 12, 24 y 48 h mediante la técnica de cristal violeta. La viabilidad del MEHP presentó una disminución significativa en las concentraciones más altas (100-1000 μM) a partir de las 6 h y que se mantuvo hasta

las 48 h. Por otra parte, en las concentraciones más bajas (1 y 5 μM) se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el número de células que incorporaron el colorante a las 48 h.

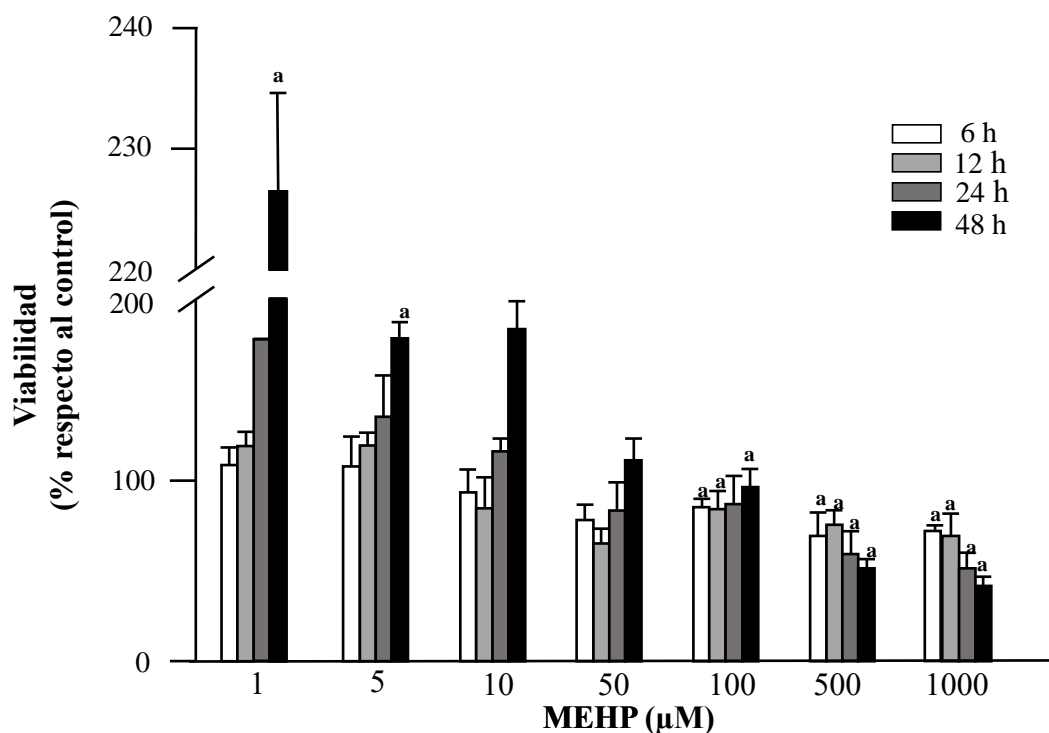


Figura 7. Viabilidad celular después de la exposición al MEHP. Células A549 a una densidad de 50,000 cel/cm² fueron incubadas con 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM de DEHP por 6, 12, 24 y 48 h. Se presenta la media \pm EE de 3 experimentos independientes. U-Mann Whitney. ^a $p < 0.05$.

3.1.2 Citotoxicidad del DEHP y MEHP por la técnica del MTT

Para corroborar la viabilidad celular se realizó la evaluación de la actividad mitocondrial por la técnica de MTT; la citotoxicidad se determina por la formación de las sales de formazán, estos cristales se forman por la reducción del MTT. Una disminución en la actividad mitocondrial se interpreta como indicador de citotoxicidad.

En la figura 8 se presenta la reducción del MTT en las células expuestas al DEHP a distintas concentraciones (1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM) por 6, 12, 24 y 48 h. Se observó una disminución en la actividad mitocondrial a partir de la concentración de 100 μM a las 24 y

48 h. El efecto causado por la concentración más alta (1000 μM) se observó desde las 12 h ($p < 0.05$).

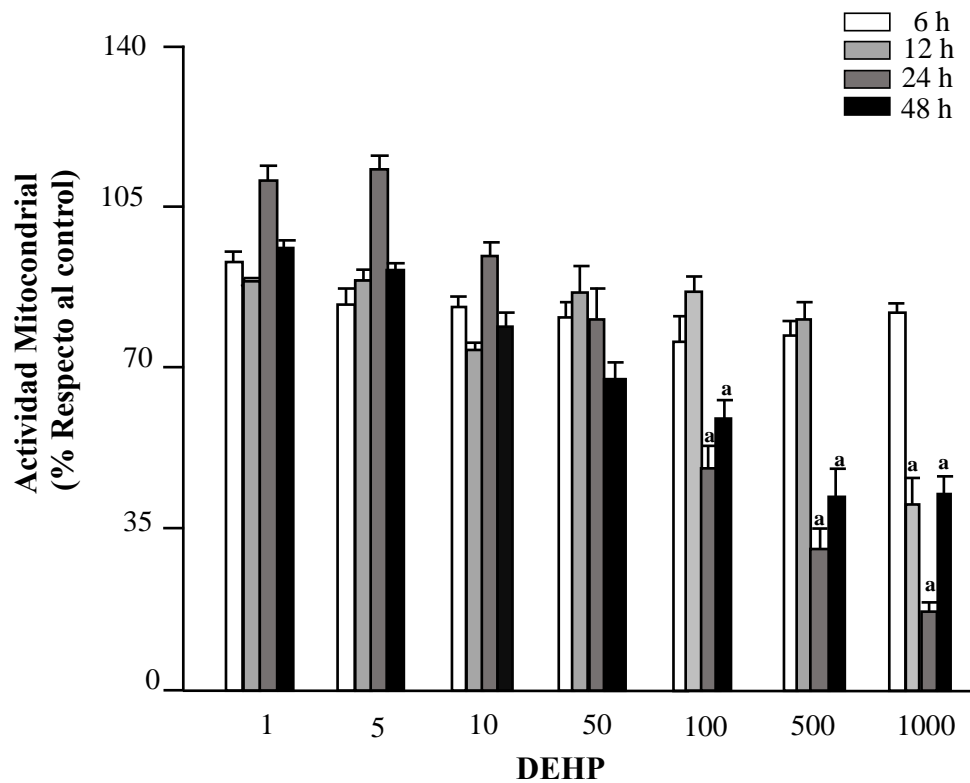


Figura 8. Actividad mitocondrial después de la exposición al DEHP. Células A549 a una densidad de 50,000 cel/cm² fueron incubadas con 0, 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM de DEHP por 6, 12, 24 y 48. Se presenta la media \pm EE de 3 experimentos independientes. No se observó diferencia significativa. U de Mann Whitney. ^a $p < 0.05$.

En la figura 9 se presenta el efecto citotóxico por la exposición a las distintas concentraciones del MEHP (1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM) a las 6, 12, 24 y 48 h. Se observó una disminución significativa en la actividad mitocondrial a las 6 h a partir de la concentración de 5 μM , mientras que, este efecto fue observado a las 24 h a partir de 50 μM y a las 48 h a partir 10 μM (U-Mann Whitney, $p < 0.05$).

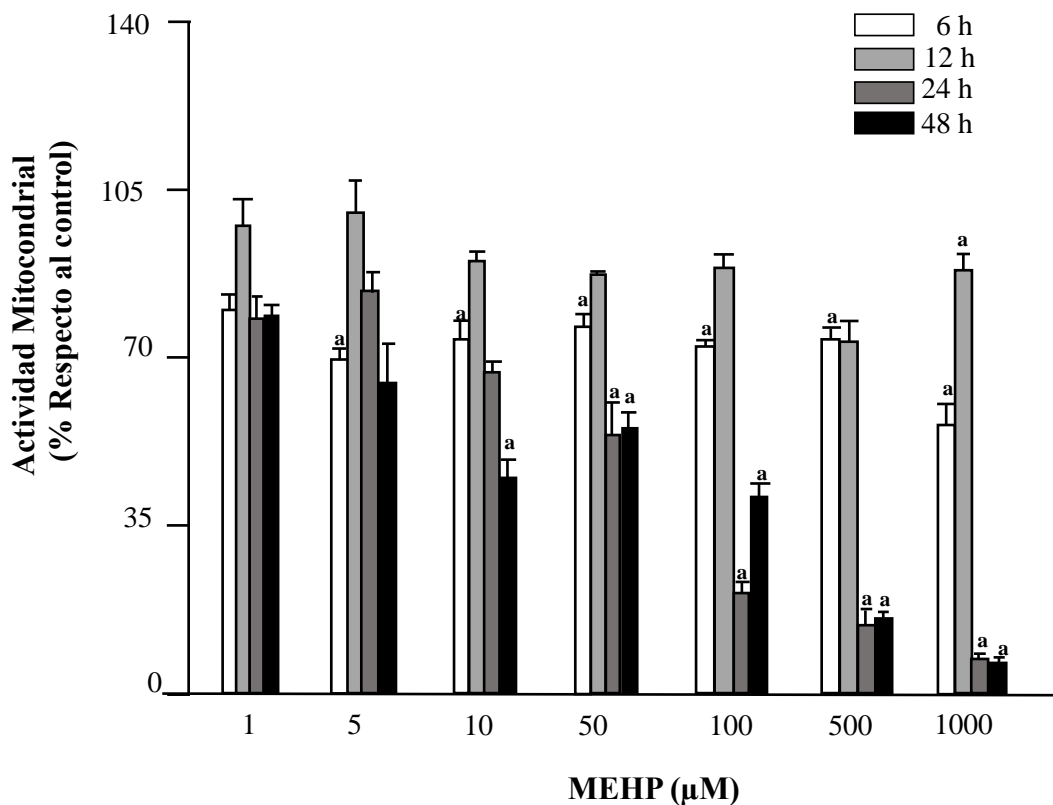


Figura 9. Actividad mitocondrial después de la exposición al MEHP. Células A549 a una densidad de 50,000 cel/cm² fueron incubadas con 0, 1, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM de DEHP por 6, 12, 24 y 48. Se presenta la media ± EE de 3 experimentos independientes. No se observó diferencia significativa. U de Mann Whitney. ^ap<0.05.

3.2 Efecto de los ftalatos sobre la proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de la incorporación de ³[H]T. En la figura 10 se presentan los efectos de la exposición a las 3 concentraciones de DEHP (1, 10 y 100 μM) evaluadas a las 24 y 48 h. Se observó un incremento significativo (p<0.05) en las cuentas por minuto (cpm) con las 3 concentraciones a ambos tiempos con respecto al control, un efecto que no fue concentración-dependiente. No se observó diferencia en las células expuestas a 1 y 10 μM a las 24 vs 48 h de exposición, mientras que si hubo diferencia significativa (p>0.05) entre los dos tiempos a la concentración de 100 μM.

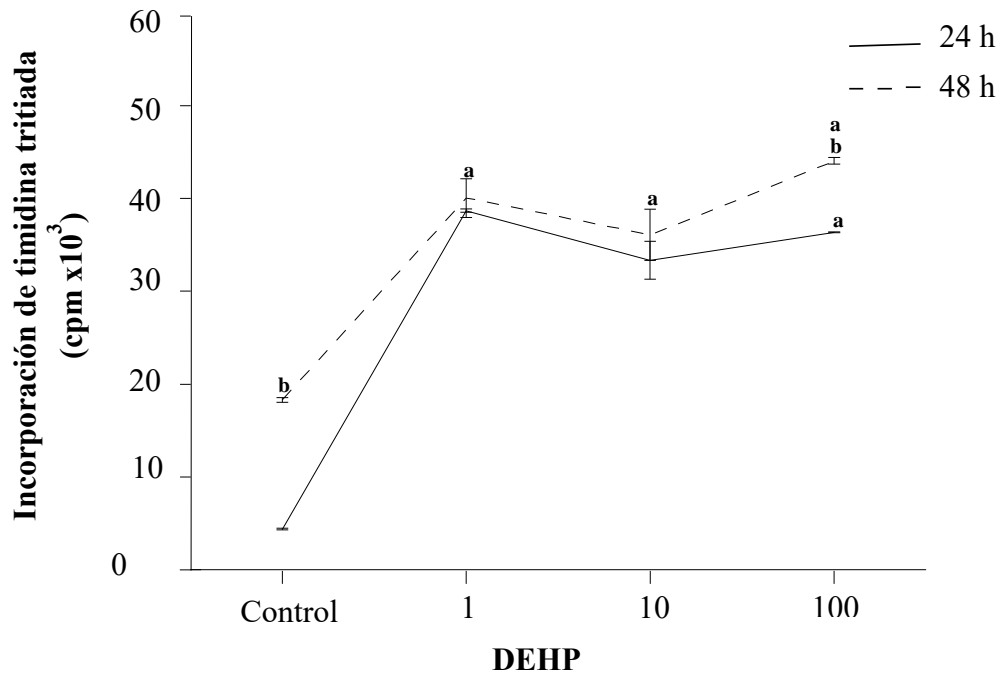


Figura 10. Proliferación de las células A549 por la exposición al DEHP. Células A549 a una densidad de 50,000 células/cm² se expusieron al DEHP (1-100 μM). Se presenta la media ± DE de 3 experimentos independientes. ANOVA de dos vías. ^ap<0.05 respecto al grupo control. ^bp<0.05 misma concentración comparando 24 vs 48 h.

En la figura 11 se presenta el efecto del MEHP sobre la proliferación celular a las concentraciones de 1, 10 y 50 μM después de 24 y 48 h de exposición. Se observó un incremento significativo en el número de cuentas por minuto (cpm) a las 3 concentraciones con respecto al control en ambos tiempos (p<0.05). Se observó una diferencia significativa (p<0.05) entre las 24 y 48 h de exposición con las 3 concentraciones. Además, se observó una tendencia significativa (p<0.05) a disminuir (concentración-dependiente) el número de cuentas a las 48 h, la cual fue significativa en la concentración de 50 μM.

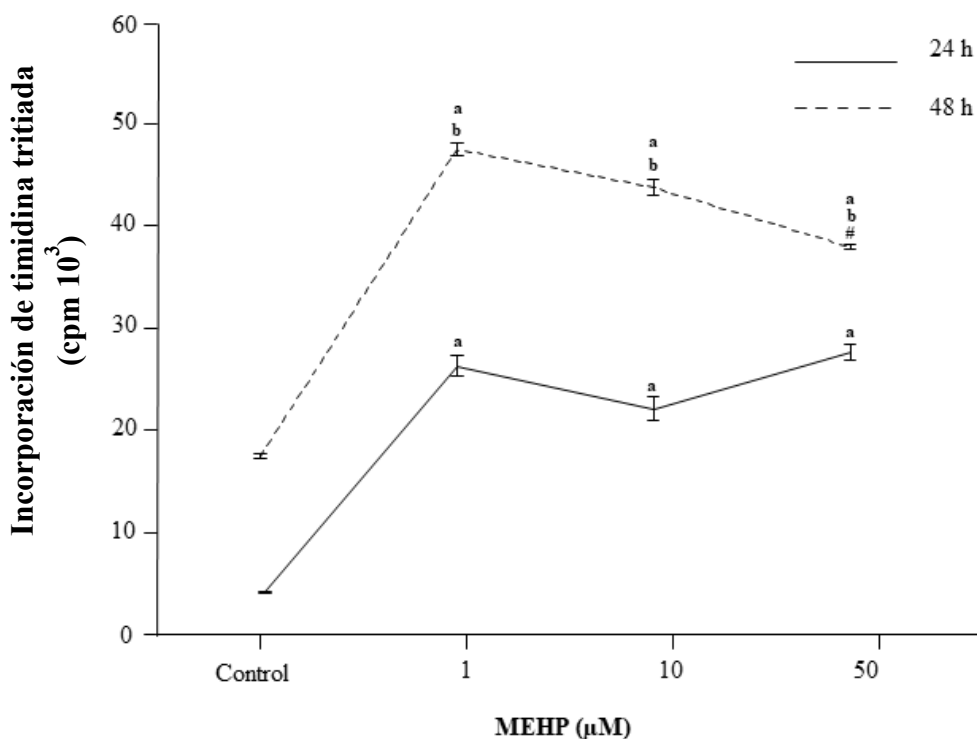


Figura 11. Proliferación de las células A549 por la exposición al MEHP. Células A549 a una densidad de 50,000 células/cm² se expusieron al MEHP (1-50 µM). Se presenta la media \pm DE de 3 experimentos independientes. ANOVA de dos vías. ^ap<0.05 respecto al grupo control. ^bp<0.05 misma concentración comparando 24 vs 48 h.

3.3 Efecto de los ftalatos sobre la migración celular (*Wound-Healing assay*)

El ensayo de la migración celular se evaluó mediante la técnica de cierre de la herida (*Wound-Healing assay*) durante 24, 48 y 72 h con un co-tratamiento con Mitomicina C para inhibir la proliferación de las células.

En la figura 12 se muestra el cierre de la herida por la exposición a 1, 10 y 100 µM de DEHP a las 24 y 48 h. Los valores del área de la herida se obtuvieron con el programa Image J, los cuales se graficaron como porcentaje de la herida con respecto al control (Fig. 12b). Se observó una diferencia significativa (p<0.05) en el porcentaje de la apertura de la herida con respecto al control en todas las concentraciones (1, 10, 100 µM) y tiempos evaluados (24, 48 y 72 h), el efecto dependiente de la concentración se observó a 24 y 48 h. Adicionalmente, la comparación en los tiempos (24, 48 y 72 h) de cada una de las concentraciones se observó un efecto tiempo-dependiente (p<0.05) en todas ellas. Finalmente se realizó una prueba de

tendencia, la cual fue significativa ($p < 0.0001$), se obtuvo un porcentaje de cierre de 76, 89.3 y 97.7% para 1, 10 y 100 μM , respectivamente.

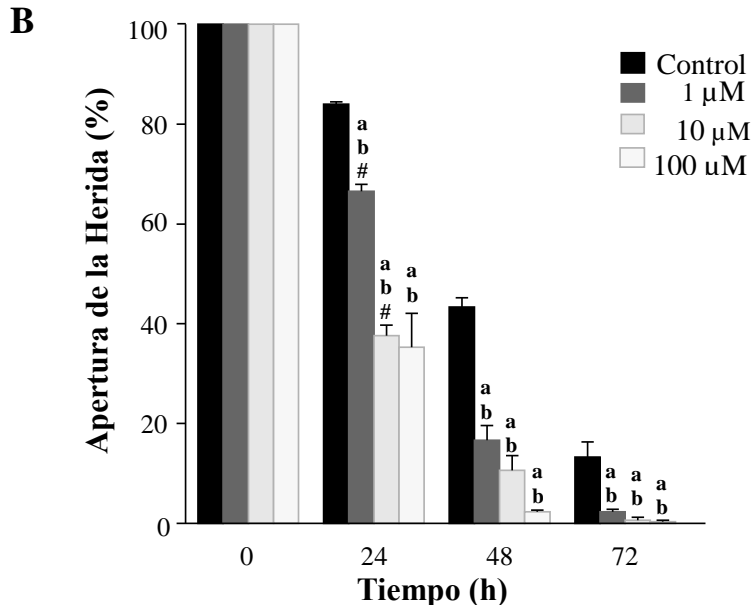
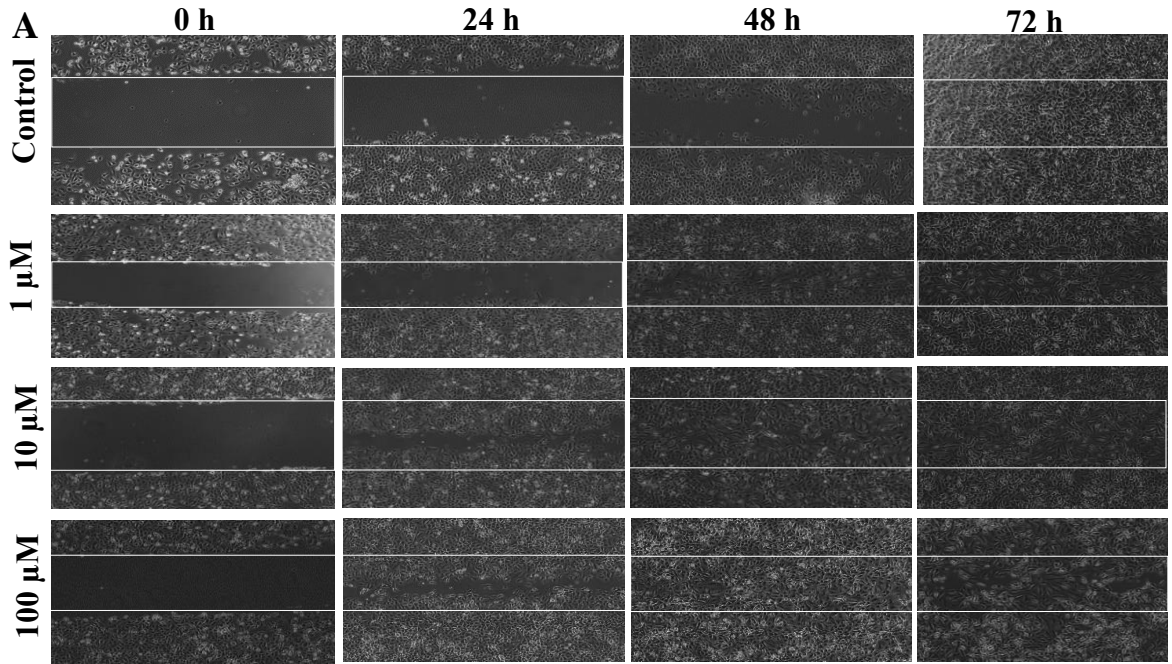


Figura 12. Migración de las células A549 por exposición al DEHP (Ensayo de la herida). Se realizó la co-exposición de las células con Mitomicina C (1.25 ng/ml) y DMSO (control) o DEHP (1, 10 o 100 μM). A) Se muestran las imágenes en campo claro 10X a las 24 y 48 h. B) Se realizó el análisis de las áreas con el programa Image J. Se presenta la media \pm EE de 3 experimentos independientes por triplicados ^a $p < 0.05$ vs el control; ^b $p < 0.05$ misma concentración vs tiempo; [#] $p < 0.05$ comparado con la concentración anterior. ANOVA de dos vías y *post hoc* de Bonferroni.

En relación con la exposición al MEHP, en la figura 13 se muestra el efecto sobre el cierre de la herida por la exposición a 1, 10 y 50 μM de MEHP a las 0, 24 y 48 h. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de la apertura de la herida con respecto al control en todas las concentraciones de MEHP (1, 10, 50 μM) y a los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 h), se observó un efecto dependiente de la concentración a las 24 y 48 h (Fig. 13b). Posteriormente se realizaron las comparaciones de los tiempos evaluados (24, 48 y 72 h) de cada una de las dosis y se encontró una concentración tiempo-dependiente ($p < 0.05$) en todas las concentraciones de MEHP a las 24 y 48 h. Finalmente, la prueba de tendencia de la disminución en la apertura de la herida o cierre de la herida fue significativa ($p < 0.05$), se obtuvo un porcentaje de cierre de 89.7 y 95.7 para 1 y 10 μM , respectivamente y el cierre total en la concentración de 100 μM .

En el ensayo del cierre de la herida por la exposición a los ftalatos se observó la presencia de células con estructura alargada. En el caso del DEHP, estas estructuras se observaron con todas las concentraciones evaluadas, mientras que, con el MEHP, las estructuras se observaron en las concentraciones de 1 y 10 μM y no en las células expuestas a 50 μM (Figs. 14 y 15). Estas estructuras alargadas difieren de las extensiones (podos) que se producen en la migración celular (EGF, control positivo de la migración).

3.4 Expresión de proteínas del surfactante por exposición a los ftalatos

Debido a que los efectos de proliferación y migración observados en la exposición al DEHP se mantuvieron e incrementaron a las 48 h se realizó la evaluación de la expresión de proteínas del surfactante C (SP-C) y surfactante B (SP-B) a este tiempo por citometría de flujo. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión de los dos surfactantes (SP-B y SP-C) con respecto al control en las concentraciones de 10 y 100 μM , sin embargo, no se observó diferencia en la expresión de SP-C y SP-B evaluados individualmente.

A

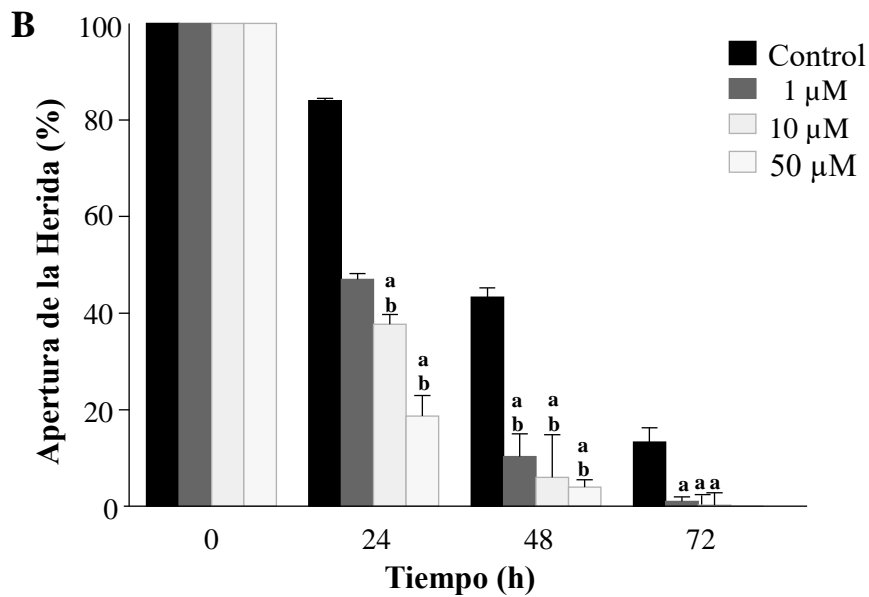
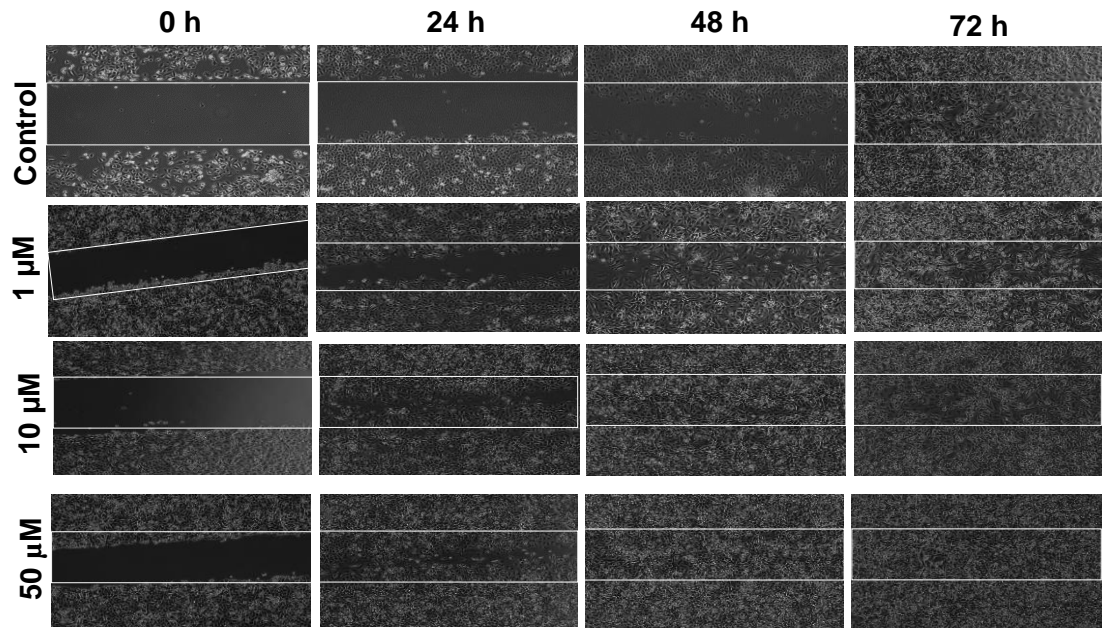


Figura 13. Migración de las células A549 por exposición al MEHP (Ensayo de la herida). Se realizó la co-exposición de las células con Mitomicina C (1.25 ng/ml) y DMSO (control) o MEHP (1, 10 o 50 μM). A) Se muestran las imágenes en campo claro 10X a las 24 y 48 h. B) Se realizó el análisis de las áreas con el programa Image J. Se presenta la media ± EE de 3 experimentos independientes por triplicados ^ap < 0.05 comparado con el control; ^bp < 0.05 misma dosis vs tiempo; [#]p < 0.05 comparado con la dosis anterior. ANOVA de dos vías y *post hoc* de Bonferroni.

En relación con el MEHP, se observó un incremento significativo dependiente de la concentración ($p < 0.05$) en la expresión del surfactante B con respecto al control (Fig. 16). Por otra parte, se observó una disminución en la expresión de ambos surfactantes (SP-B y SP-C) con respecto al control en la concentración más alta de 50 μM y en la misma concentración se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración del surfactante C.

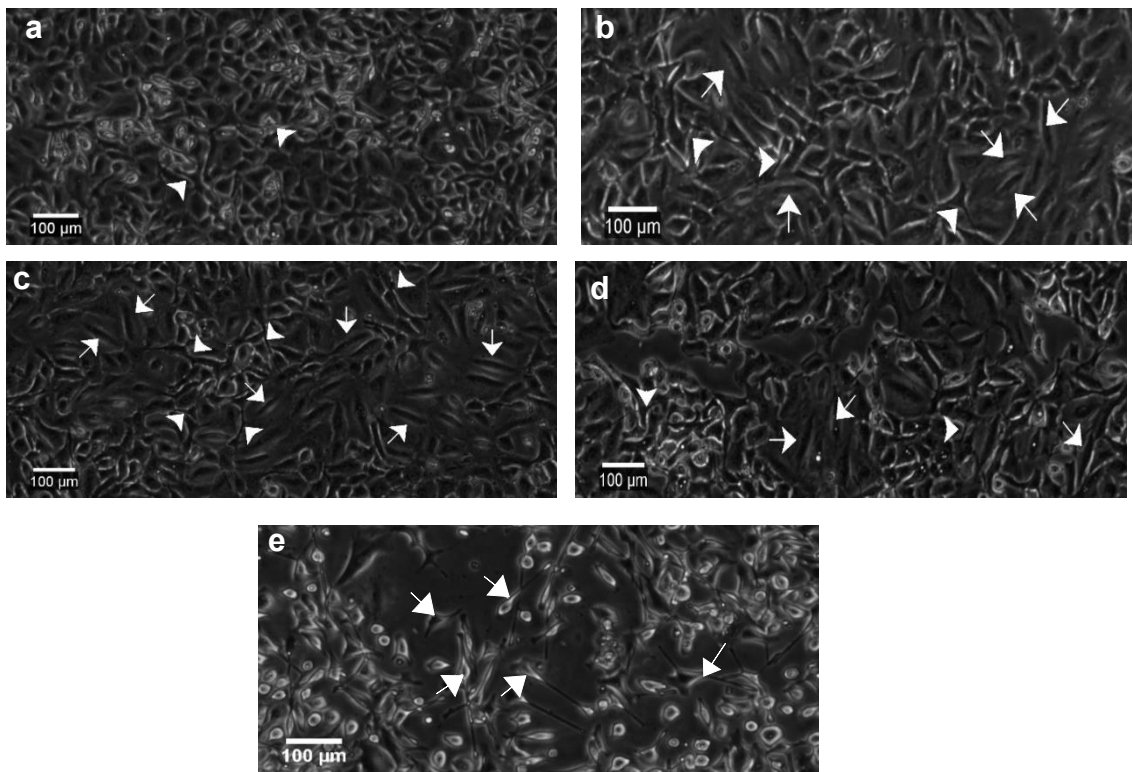


Figura 14. Estructuras alargadas de las células A549 por exposición al DEHP. Las células fueron expuestas a 0 (a), 1 (b), 10 (c) y 100 (d) μM de DEHP y EGF (50 ng/ml) (e) por 72 h. Las células fueron co-expuestas con Mitomicina C (1.25 ng/ml). Las flechas indican la presencia de estructuras alargadas y las cabezas de flecha indican las extensiones normales (podós) formadas en la migración celular.

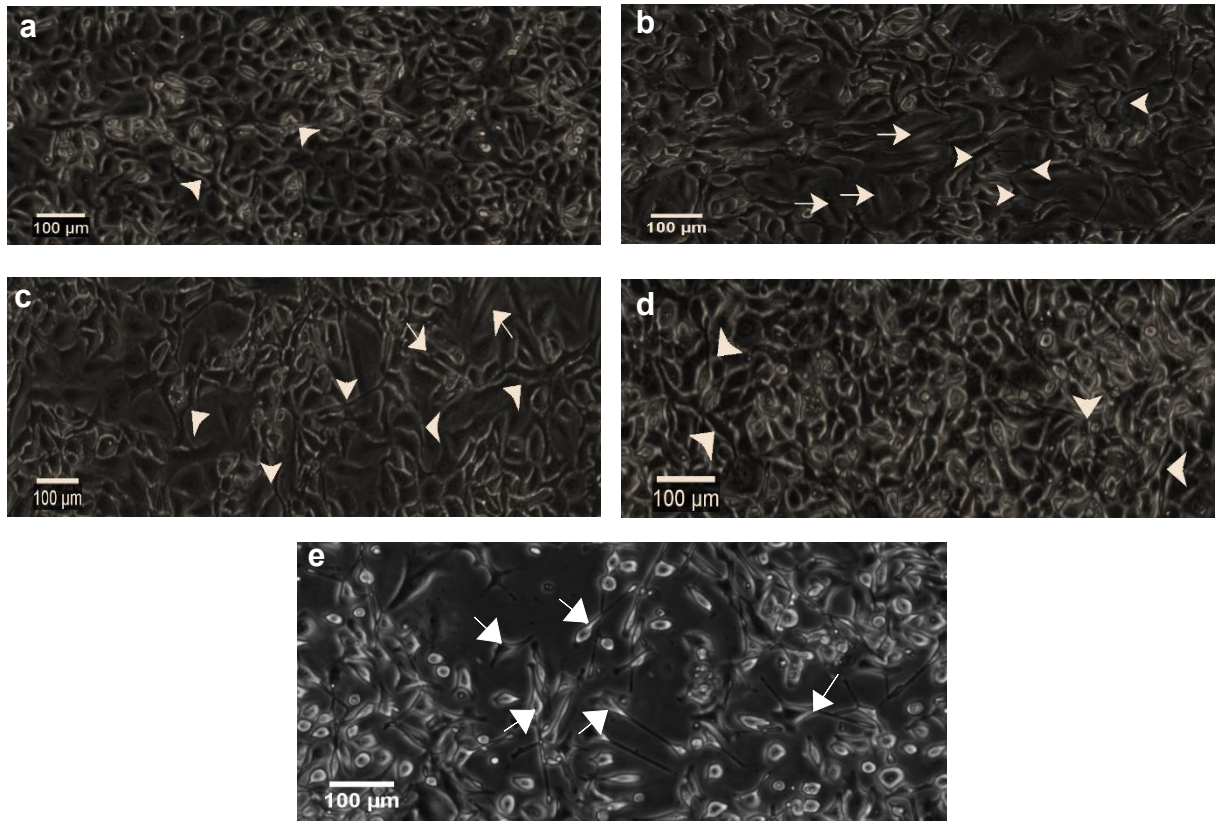


Figura 15. Estructuras alargadas de las células A549 por exposición al MEHP. Las células fueron expuestas a 0 (a), 1(b), 10 (c) y 50 (d) μM de MEHP y EGF (50 ng/ml) (e) por 72 h. Todos los grupos fueron co-expuestos con Mitomicina C (1.25 ng/ml). Las flechas indican la presencia de estructuras alargadas y las cabezas de flecha indican las extensiones normales (podos) formadas en la migración celular.

3.5 Expresión de E-cadherina por la exposición al DEHP y MEHP

La expresión de la proteína E-cadherina por la exposición al DEHP (1, 10 y 100 μM) o MEHP (1, 10 y 50 μM) a las 48 h se cuantificó mediante citometría de flujo. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de células positivas para la proteína E-cadherina por la exposición a ambos ftalatos con respecto al control (Fig. 17); no se observó un efecto dosis-dependiente. Se observó un efecto más pronunciado por la exposición al MEHP comparado con el DEHP, con una disminución entre 20-30% y 40-45%, respectivamente.

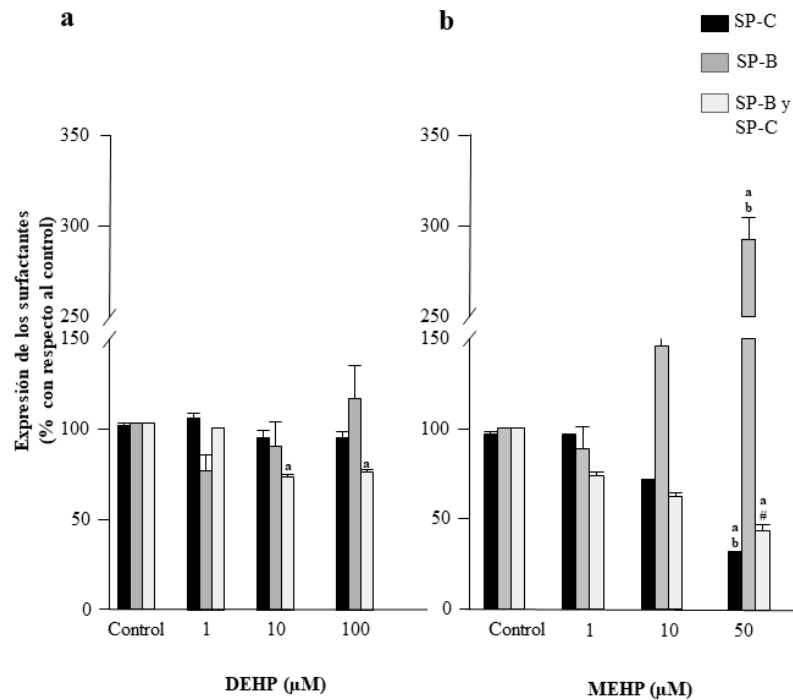
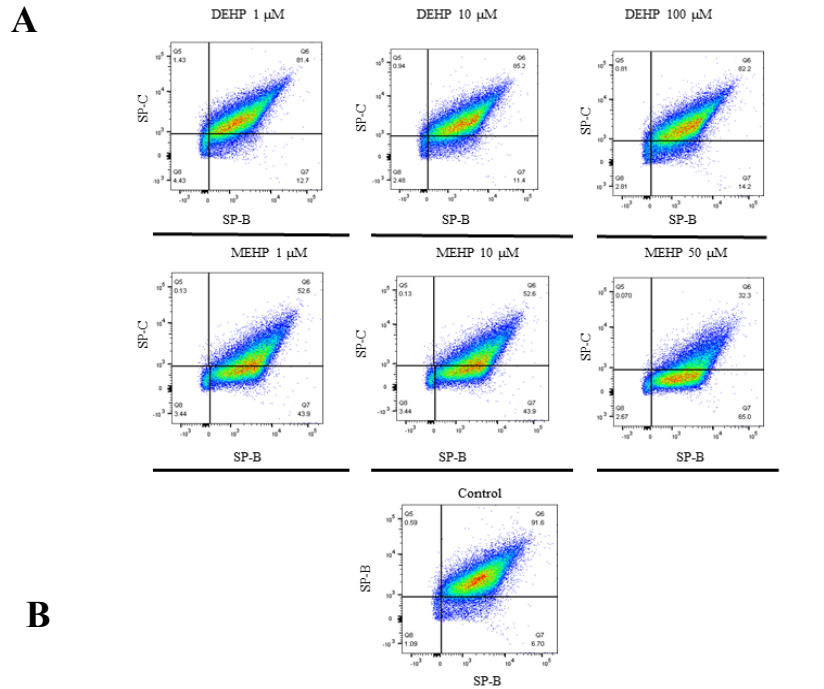


Figura 16. Expresión de las proteínas del surfactante C (SP-C) y surfactante B (SP-B) por la exposición a DEHP y MEHP. Las células fueron expuestas a 1, 10 y 100 μM de DEHP, ó 1, 10 y 50 μM de MEHP durante 48 h y el surfactante fue evaluado por citometría de flujo en una población de 50,000 células. A) Las imágenes representan los citogramas de cada exposición; B) Expresión cuantitativa de los surfactantes por exposición al DEHP (a) o al MEHP (b). Se presenta la media \pm EE de 3 experimentos independientes por triplicado ^a $p < 0.05$ respecto al control; ^b $p < 0.05$ respecto a la exposición previa; [#] $p < 0.05$ respecto a SP-B y SP-C. ANOVA de dos vías y *post hoc* de Bonferroni.

3.6 Expresión de fibronectina por la exposición al DEHP y MEHP

La expresión de fibronectina (Fig. 18) se evaluó mediante citometría de flujo en las células A549 expuestas a DEHP (1, 10 y 100 μM) o MEHP (1, 10 y 50 μM). Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) por la exposición a ambos ftalatos comparado con el control. Por otra parte, de manera individual presentaron un efecto diferencial, el DEHP presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) concentración-dependiente en donde su mayor incremento con respecto al control (2.3 veces) se presentó a la concentración más baja (1 μM) y la diferencia más baja con respecto al control (1.8 veces) a la concentración de 100 μM . Mientras tanto, el MEHP presentó un incremento significativo concentración-dependiente, en donde la concentración más baja (1 μM) presentó un incremento de 1.4 veces y a la concentración más alta (50 μM) fue de 1.8 veces.

3.7 Expresión de factores de crecimiento por exposición a los ftalatos

3.7.1 Niveles de mRNA del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

La expresión de factores de crecimiento, activación de receptores, proliferación y migración celular pueden ser modificados por la exposición a xenobióticos (Haarmann-Stemman, 2009). En este estudio se evaluó el efecto en la expresión del PDG por la exposición al DEHP o MEHP a las 24 h (Fig. 19). Se observó un efecto diferencial entre la exposición al DEHP (compuesto padre) y el MEHP (metabolito). El DEHP mostró una disminución en la expresión del mRNA, la cual fue significativa ($p < 0.05$) a la concentración más alta (100 μM) con una disminución de 70%. Mientras que, el MEHP mostró un incremento en los niveles de PDGF, el cual fue significativa ($p < 0.05$) a la concentración de 50 μM con un incremento de 90%.

3.7.2 Expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)

Una migración celular incrementada y un incremento en la expresión del *VEGF* están asociados con la metástasis en procesos carcinogénicos (Hanahan & Weinberg, 2011). En este estudio se evaluó la expresión ($\Delta\Delta\text{Ct}$) del *VEGF* en células A549 expuestas a DEHP o MEHP a las 24 h (Fig. 20). No se observaron diferencias significativas en ninguna de las concentraciones del DEHP (1, 10 y 100 μM) o MEHP (1, 10 y 50 μM) respecto al control.

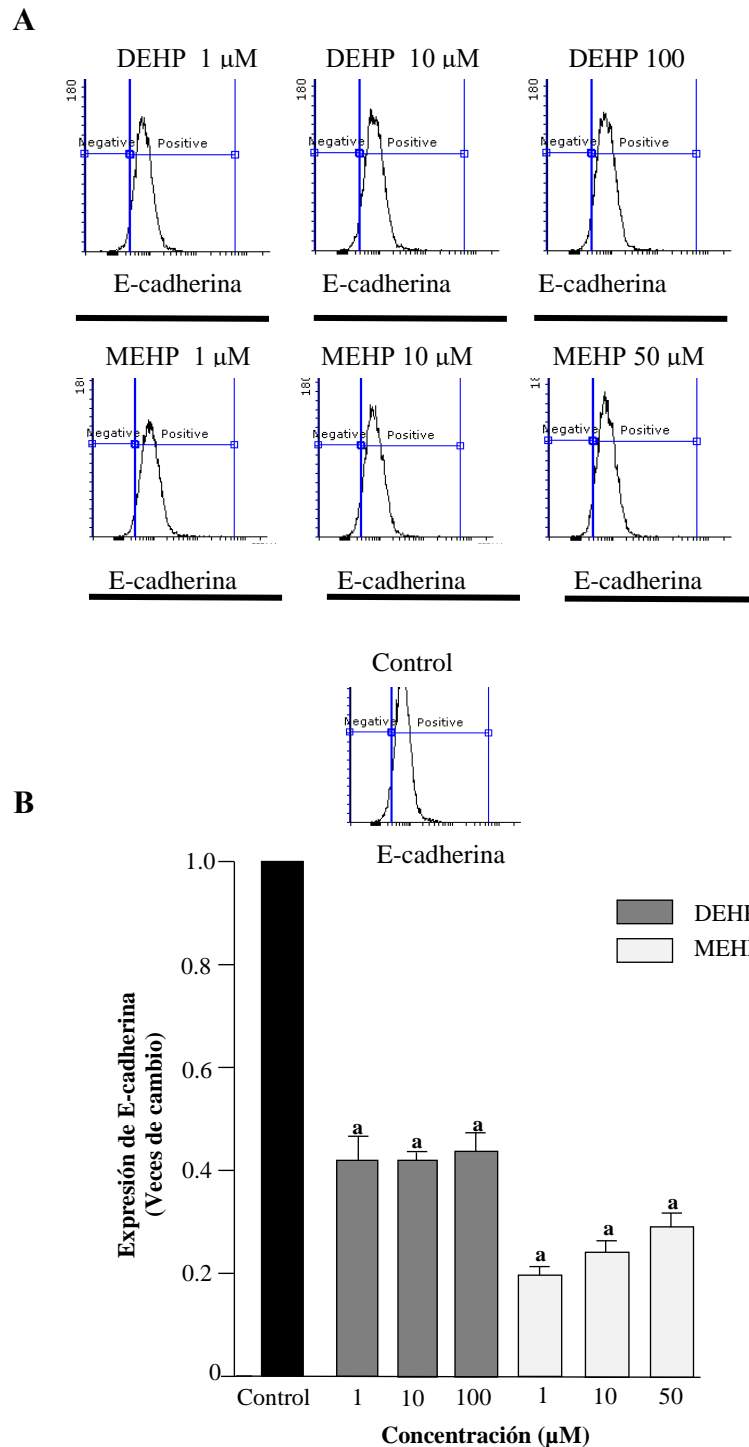


Figura 17. Expresión de E-cadherina por exposición al DEHP y MEHP (veces de cambio). Se evaluó una población de 50,000 células A549 expuestas a DEHP (1, 10 y 100 μM) o MEHP (1, 10 y 50 μM) a las 48 h. A) Citogramas de la exposición a ambos ftalatos y el control (DMSO); B) Análisis cuantitativo de los citogramas. Se presenta la media ± EE de 3 experimentos independientes por triplicado ^a $p < 0.05$ respecto al control; ANOVA de dos vías y *post hoc* de Bonferroni.

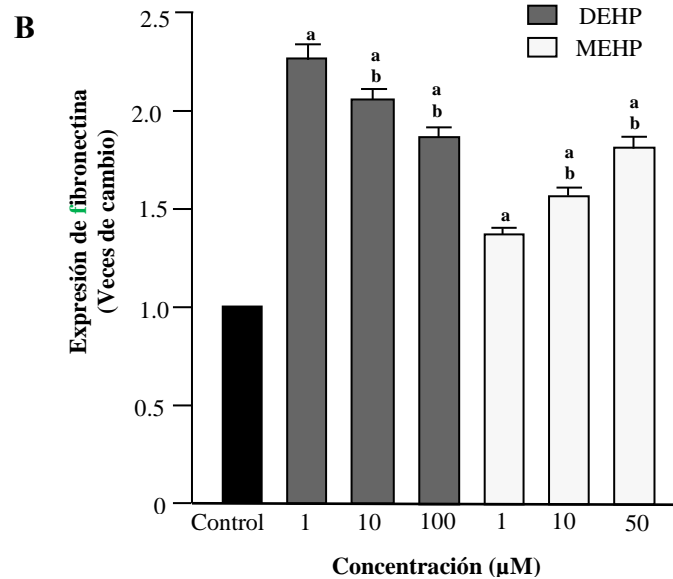
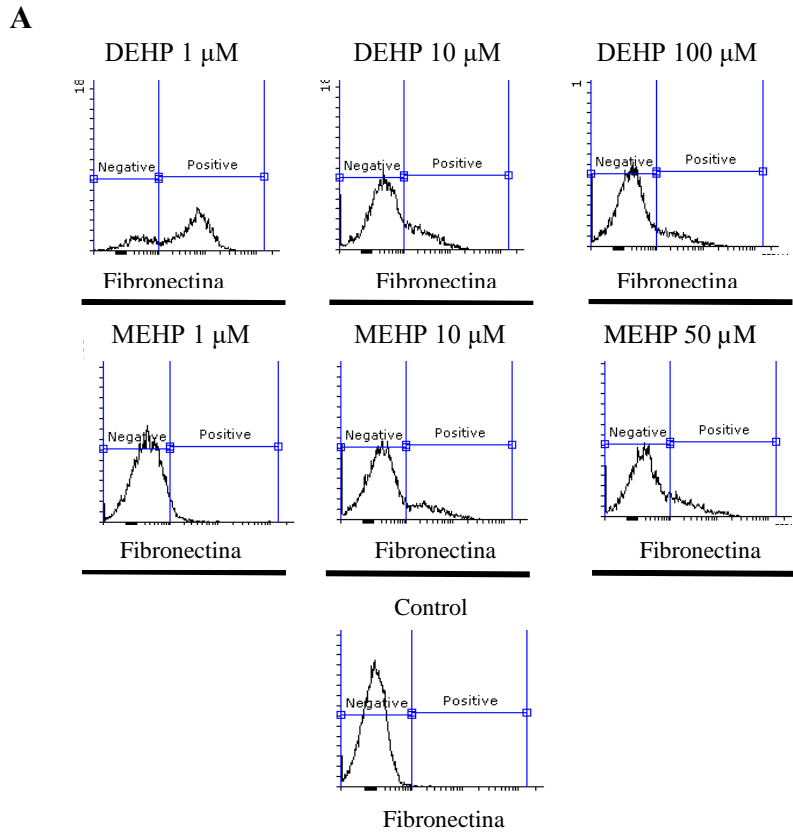


Figura 18. Expresión de fibronectina por exposición al DEHP y MEHP (veces de cambio). Se evaluó una población de 50,000 células expuestas a DEHP (1,10 y 100 μM) o MEHP (1, 10 y 50 μM) por 48 h por citometría de flujo. A) Citogramas de la exposición a los ftalatos y control (DMSO); B) Análisis cuantitativo de los citogramas. Se presentan las medias \pm EE de 3 experimentos independientes por triplicado ^a $p < 0.05$ respecto al control; ^b $p < 0.05$ respecto a la previa exposición ANOVA de dos vías y *post hoc* de Bonferroni.

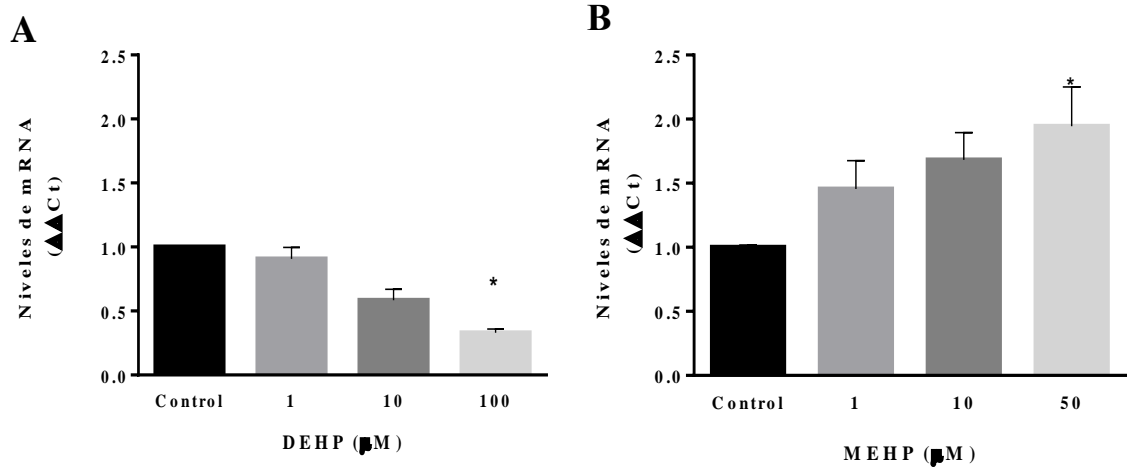


Figura 19. Expresión del gen *PDGF* por exposición a los ftalatos ($\Delta\Delta Ct$). Células A549 a una densidad de 50,000 células/cm² se incubaron con DEHP (1, 10 y 100 μM) (A) o MEHP (1, 10 y 50 μM) (B). Se presenta la media \pm DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$ con respecto al control. ANOVA de una vía y *post hoc* de Bonferroni.

3.7.3 Expresión del gen que codifica para la proteína Sprouty (*Spry*)

El *Spry* es un regulador negativo para el gen del *FGF* (Gross et al., 2001). Se evaluó el efecto de la exposición al DEHP o MEHP sobre este regulador negativo (*Spry*) a las 24 h. No se observó un efecto en la expresión del mensajero a ninguna de las concentraciones evaluadas del DEHP (1, 10 y 100 μM) o MEHP (1, 10 y 50 μM) (Fig. 21).

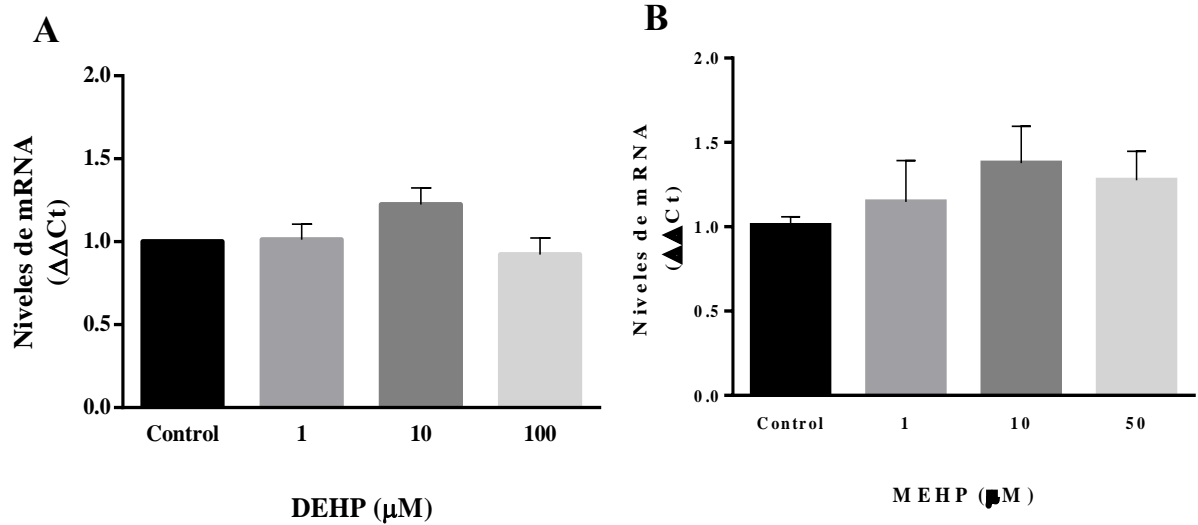


Figura 20. Expresión del gen *VEGF* por exposición a los ftalatos (ΔΔCt). Células A549 a una densidad de 50,000 células/cm² se incubaron con A) DEHP (1, 10 y 100 μM) o B) MEHP (1, 10 y 50 μM). Se presenta la media ± DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * p<0.05 con respecto al control. ANOVA de una vía y *post hoc* de Bonferroni.

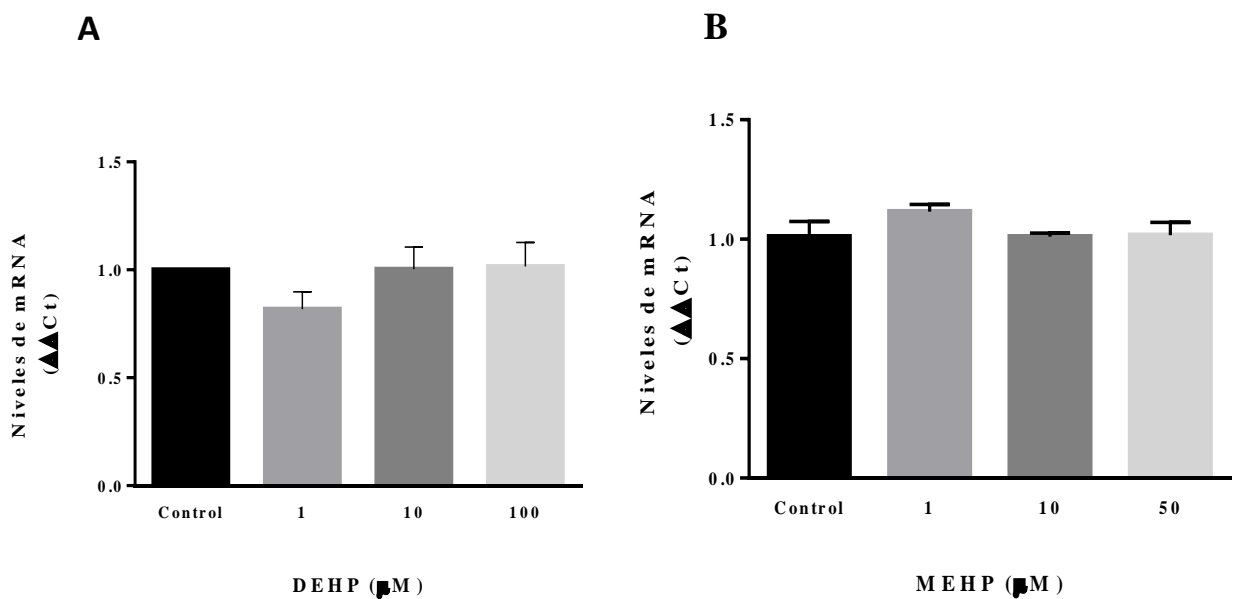


Figura 21. Expresión del gen *Spry* por exposición a los ftalatos (ΔΔCt). Células A549 a una densidad de 50,000 células/cm² se incubaron con DEHP (1, 10 y 100 μM) (A) o MEHP (1, 10 y 50 μM) (B). Se presenta la media ± DE de 3 experimentos independientes por triplicado. * p<0.05 con respecto al control. ANOVA de una vía y *post hoc* de Bonferroni.

4. DISCUSIÓN

Los ftalatos DEHP y su metabolito MEHP son compuestos plastificantes que proveen flexibilidad a los productos plásticos, principalmente aquellos constituidos de PVC, y se encuentran además en una amplia variedad de productos de uso común, como recipientes para alimentos y bebidas, pinturas, maquillajes, ropa y dispositivos médicos, por mencionar algunos. A pesar de que en la Unión Europea y en Estados Unidos ha sido prohibido el uso del DEHP desde el año 2005, es considerado actualmente como un contaminante emergente de relevancia en salud pública, debido a que puede encontrarse de manera ubicua en el ambiente. Estos ftalatos se han encontrado en el aire intramuros, por lo que pueden ingresar al organismo por inhalación y alcanzar el epitelio alveolar. A pesar de ser compuestos ubicuos y que se han asociado con efectos en el pulmón en modelos *in vivo* y en estudios epidemiológicos, no son considerados como compuestos neumotóxicos. Entre los efectos reportados están alteraciones histológicas como simplificación alveolar, alargamiento celular, e incremento en las tasas de proliferación. Estos efectos han sido observados en niños con enfermedades tales como displasia broncopulmonar (BPD, por sus siglas en inglés) y SDRA (Roth et al. 1988; Magliozzi et al. 2003; Rosicarelli and Stefanini 2009).

En este estudio observamos algunos efectos tóxicos sobre las células A549 similares a los previamente reportados en modelos *in vitro*, como son proliferación y alargamiento de las células, sugiriendo que los ftalatos pueden ser neumotóxicos a concentraciones consideradas como seguras. De acuerdo con agencias internacionales (ATSDR, 1995), el límite de exposición ocupacional para el DEHP es de 5 mg/m^3 en un horario de 8 h, lo que representa una concentración de $12.8 \text{ } \mu\text{M}$ y una concentración de 5 g/m^3 (12.8 mM) se considera perjudicial para la vida. En nuestro estudio se probaron 3 concentraciones consideradas ambientalmente relevantes de DEHP (1, 10 y $100 \text{ } \mu\text{M}$) y de MEHP (1, 10 y $50 \text{ } \mu\text{M}$), y observamos efectos en las células A549 desde la concentración de $1 \text{ } \mu\text{M}$ (10 veces menor que el límite de una jornada de trabajo), tales como proliferación, cambio en los niveles proteicos de surfactantes, E-cadherina y fibronectina.

4.1 Efectos en la viabilidad celular

En este estudio se llevó a cabo la exposición de las células A549 al compuesto padre DEHP y a su metabolito el MEHP y se evaluó la viabilidad celular con dos técnicas, el cristal violeta (CV) que toma en cuenta la formación de complejos que el compuesto tiene con el ADN y

proteínas, y el MTT que evalúa la actividad mitocondrial. Ambas técnicas presentaron diferencias en la evaluación del efecto citotóxico. Por una parte, el DEHP no presentó efecto citotóxico significativo en las células A549 evaluado con el CV y, por otra parte, se observó un efecto citotóxico con el MTT a las concentraciones de 100-1000 μM . Mientras que, la exposición al MEHP mostró un efecto citotóxico con ambas técnicas a las concentraciones de 50-1000 μM , en todos los tiempos en comparación con el DEHP que presentó menor citotoxicidad. Sin embargo, con la técnica del CV se observó un incremento en la cantidad del colorante a concentraciones bajas (1-10 μM), lo que sugiere un posible efecto proliferativo que se confirmó con la incorporación de timidina tritiada. Esta diferencia podría deberse a que los mecanismos citotóxicos que evalúa cada técnica son diferentes. El CV evalúa la interacción con el ADN y proteínas y el MTT la actividad mitocondrial, por lo tanto, el MTT podría considerarse una técnica más sensible a los efectos que los ftalatos podrían tener en las células.

El efecto citotóxico del DEHP y MEHP ha sido previamente observado en modelos *in vivo* y modelos *in vitro*. Magliozzi et al. (2003) reportaron un incremento en la proliferación de los neumocitos tipo II por la exposición al DEHP en un modelo *in vivo* de crías de ratas Albino Wistar, cuyas madres estuvieron expuestas por vía oral durante el embarazo a 1 g DEHP/kg/día. Por otra parte, los resultados observados con la técnica de MTT coinciden con lo reportado por Erkekoglu et al. (2010) en células MA-10 (células tumorales de Leydig) expuestas a concentraciones de DEHP y MEHP similares a las de nuestro estudio (1- 1000 μM de DEHP; 1- 10 μM de MEHP), mostrando mayor efecto con el MEHP. En general, los resultados observados con ambas técnicas demuestran que el metabolito MEHP es más citotóxico que el compuesto padre (DEHP).

4.2 Efectos en la proliferación celular

Dentro del efecto proliferativo de ambos ftalatos, se observó un incremento en todas las concentraciones evaluadas de DEHP (1, 10 y 100 μM) y MEHP (1, 10 y 50 μM) en la incorporación de la timidina en comparación con el grupo control. Este efecto coincide con lo observado en estudios *in vivo*, como el de Magliozzi et al. (2003) y Rosicarelli & Stefanini (2009), en los cuales se observaron incrementos en el número de células del epitelio alveolar tipo II (AE2) (tipo celular que representa las células A549) en ratas recién nacidas de madres expuestas por vía oral a 1 g DEHP /kg/día durante una semana antes del parto y dos días

posterior a este. Sin embargo, en el estudio de Wang et al. (2017) utilizando células A549 expuestas a concentraciones de 1 nM-1 mM de DEHP no observaron un efecto proliferativo. La discrepancia en los resultados de ambos estudios puede deberse a las técnicas y condiciones utilizadas para la evaluación de la proliferación. En el estudio de Wang et al. evaluaron la proliferación mediante un kit comercial que evalúa la reducción de una sal de tetrazolio a cristales de formazán, mientras que, en nuestro estudio utilizamos una base nitrogenada marcada, siendo esta técnica más sensible; adicionalmente utilizaron una concentración de SFB de 10% y en nuestro estudio fue de 0.5%. Por otra parte, interesantemente observamos un efecto dual en la exposición al MEHP, un incremento en la proliferación a concentraciones bajas (1 y 10 μM) y un efecto citotóxico a concentraciones altas (50 μM). Una contribución importante de nuestro estudio es que el efecto proliferativo del MEHP no había sido reportado anteriormente.

4.3 Efectos en la migración celular

La migración celular observada con el ensayo de herida (*Wound-healing assay*) mostró que el DEHP y MEHP inducen la migración celular de una manera más rápida en comparación con las células control; para evitar que el efecto observado estuviera relacionado con la proliferación, las células se co-expusieron con Mitomicina C, compuesto que inhibe la proliferación (Barrandon & Green, 1987). Estos resultados coinciden con los descritos por Wang et al. (2017), quienes observaron una migración concentración-dependiente de las células A549 a concentraciones de 0.01-1 μM de DEHP evaluada a 48 h. En nuestro estudio observamos un efecto tiempo-dependiente a 24, 48 y 72 h, pero no concentración-dependiente.

Interesantemente, en nuestro estudio observamos la presencia de células alargadas a las 72 h de exposición con ambos ftalatos que no fueron observadas en el tratamiento con DMSO y tampoco con el tratamiento con EGF (control positivo). En primera instancia se consideró que fueran estructuras relacionadas con los podos que se producen en el desplazamiento de las células durante el ensayo; sin embargo, estas estructuras permanecieron al finalizar el cierre y tenían una forma diferente a las extensiones celulares formadas en la migración típica de las células. Estructuras alargadas en células A549 fueron previamente reportadas por Kim et al. (2007), quienes incubaron las células A549 con TGF- β (0.05-5 ng/ml) y los autores concluyeron que las estructuras tenían morfología tipo-fibroblastos. Un incremento en los

niveles de TGF- β se describieron previamente en fetos de ratón expuestos a DEHP (100, 200 y 500 mg/kg/día, vía oral) (Liu et al., 2008) y en ratas jóvenes expuestas a DEHP y MEHP (100- 300 mg/kg/día, vía intragástrica) (Ma et al., 2012). Por lo tanto, un posible mecanismo de la aparición de estas estructuras alargadas podría ser por un incremento en TGF- β por la incubación con los ftalatos. Adicionalmente, estas estructuras alargadas podrían representar la pérdida del fenotipo de las células A549 correspondiente a neumocito tipo II, el cual es de forma estrellada. Este cambio morfológico podría sugerir una pérdida epitelial, lo que posteriormente se verificaría, cambiando las funciones y la respuesta que podrían tener hacia contaminantes ambientales, haciendo susceptible al epitelio alveolar a desarrollar patologías, entre ellas el SDRA, fibrosis, etc. (Selman & Pardo, 2006; Wang et al. 2017).

4.4 Efectos en la expresión de proteínas del surfactante

El incremento en la proliferación y la pérdida de la morfología característica de las células A549 podrían ser indicativos de que las células están perdiendo el fenotipo epitelial, debido a la exposición al DEHP y MEHP, por lo tanto, se evaluaron algunas proteínas indicadoras del fenotipo epitelial. Las células A549 son representativas de los neumocitos tipo II, los cuales tienen la característica de secretar surfactante. El surfactante C es secretado única y exclusivamente por los neumocitos tipo II maduros, es decir por las células epiteliales, mientras que, el surfactante B es importante para mantener la homeostasis de la célula, y se sabe que cambios en la expresión de este surfactante podrían ser indicativos de una célula disfuncional, además de que responde ante estímulos inflamatorios (Baatz et al., 1990; Weaver & Conkright, 2001). Por lo tanto, en este estudio se evaluaron estos dos surfactantes. Los resultados indicaron que el MEHP presenta un mayor efecto en las proteínas del surfactante en comparación con el DEHP, lo que coincide con los efectos evaluados (citotoxicidad, proliferación y migración de las células A549). En particular, el MEHP mostró una disminución en los niveles de SP-C y un incremento en los niveles de SP-B (casi 4 veces), sin embargo, las células disminuyeron los valores de ambos (SP-C y SP-B) cuando se evaluaron en conjunto. El incremento de SP-B pudiera explicarse por la respuesta a un estímulo inflamatorio, ya que se sabe que el MEHP tiene una estructura similar a las prostaglandinas D₂, 9 α , 11 β F_{2 α} consideradas como potentes hiper reactores de las vías áreas (Oie et al., 1997; Bustamante-Montes et al., 2001). Un efecto observado para ambos ftalatos fue la disminución significativa de ambos surfactantes (SP-C y SP-B), lo que sugiere la

pérdida del fenotipo epitelial. Hasta este momento, los resultados sugerían que los ftalatos promovían la proliferación y migración de las células, y que, al mismo tiempo, estas células estaban perdiendo su fenotipo epitelial, por lo que se procedió a la evaluación de marcadores de tipo epitelial y marcadores mesenquimales como son algunos marcadores de la EMT (E-cadherina, fibronectina y α -SMA).

4.5 Proteínas de la transición epitelio-mesénquima (EMT): E-cadherina, α - SMA y fibronectina

Debido a la pérdida en los niveles del surfactante se llevó a cabo la evaluación de proteínas implicadas en la pérdida de la polaridad epitelial de las células pulmonares. A este proceso de pérdida o cambio en la polaridad celular se le conoce como EMT (Selman & Pardo, 2006). Se evaluó una proteína característica de las células epiteliales como es E-cadherina que es una proteína implicada en las uniones estrechas que permite la comunicación entre un conjunto de células epiteliales (Roy & Berx, 2008; Kalluri & Weinberg, 2009), la pérdida en dicha proteína puede ser considerada un factor importante para la pérdida de la polaridad celular y podría estar implicada en la EMT (Kalluri & Weinberg, 2009). Una disminución en esta proteína está asociado a la pérdida de características epiteliales, y en conjunto con proteínas mesenquimales como fibronectina y α - SMA que pueden ser utilizadas como marcadores de la EMT. En el caso de la fibronectina, esta proteína se encuentra presente en las células mesenquimales no diferenciadas, esto fue reportado por Pearlstein et al. (1979) en el riñón embrionario, en donde la proteína se encontraba expresada, pero conforme se llevaba a cabo su desarrollo y cambio a células epiteliales, la expresión de la fibronectina desapareció.

En este estudio se observó una alteración en proteínas implicadas en la EMT como fue la disminución en la expresión de E-cadherina y un incremento en fibronectina por la exposición a DEHP y MEHP con respecto al control, mientras que los niveles de α - SMA no se modificaron. En conjunto, los cambios en la expresión de E-cadherina, fibronectina y surfactante, así como el cambio hacia estructuras alargadas podrían indicar que estas células están sufriendo la pérdida de la polarización y adicionalmente, podrían estar adquiriendo una nueva estructura conocida como células parecidas a fibroblastos. Este cambio fue reportado por Kim et al. (2009), la exposición al factor de crecimiento tumoral β (TGF β) en células

A549, este factor (TGF β) que podría ser alterado por la exposición al DEHP, o de manera indirecta por el efecto de otros factores de crecimiento como PDGF, VEGF y Spry.

4.6 Efectos del DEHP y MEHP sobre los factores de crecimiento: VEGF, PDGF y Spry

Se evaluaron los efectos en la expresión (mensajero) de distintos factores de crecimiento implicados en varias etapas del desarrollo pulmonar, así como en algunas enfermedades, estos fueron el *VEGF*, PDGF y *Spry* que es activado cuando la vía de señalización del FGF es activada. Estos factores han sido descritos en el desarrollo (Chinoy, 2003), en cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2010) y fibrosis (Kalluri & Neilson, 2003; Willis & Borok, 2007; Wu et al., 2013).

De los tres factores evaluados, solo se observaron cambios en los niveles del mRNA de *PDGF* con ambos ftalatos, aunque la incubación con el DEHP y MEHP mostraron efectos diferenciales. Por una parte, la exposición al DEHP en las células A549 presentó una tendencia a disminuir la expresión del *PDGF*, mientras que la exposición al MEHP mostró un incremento, esto puede ser explicado por afinidades diferentes de cada ftalato a receptores o por activar vías diferentes, por ejemplo: el MEHP mimetiza prostaglandinas (Oie et al., 1997; Bustamante-Montes et al., 2001), mientras que el DEHP no lo hace. Sin embargo, no existen estudios que hayan evaluado los efectos del DEHP y MEHP sobre los factores de crecimiento estudiados, pero sí hay estudios que han evaluado efectos asociados, en donde la activación de los factores de crecimiento es importante. Por ejemplo, por la similitud que el MEHP tiene con las prostaglandinas D_2 , 9α , $11\beta F_{2\alpha}$ (Oie et al., 1997; Bustamante-Montes et al., 2001), este ftalato podría iniciar un mecanismo proinflamatorio y activar factores de crecimientos implicados en la inflamación como es el PDGF (citocina fibrogénica) (Antoniades et al., 1982). Otro ejemplo, se ha reportado que los factores como VEGF, FGF, PDGF y EGF están incrementados en la endometriosis y, por otro lado, niveles altos de DEHP y MEHP han sido asociados con esta enfermedad, por lo tanto, podríamos inferir que la exposición a los ftalatos podría incrementar los niveles de estos factores y tener un efecto sobre la endometriosis (Biberoglu & Biberoglu, 2014). Por otro lado, también hay que considerar que el DEHP es metabolizado por la acción de lipasas a su metabolito principal el MEHP (aproximadamente 12%), además de sufrir otras reacciones como oxidación y conjugación, lo que genera la formación de otros metabolitos (Albro et al., 1973; Foster et

al., 1998; Barr et al., 2003; Latini et al., 2003). Por lo tanto, otros metabolitos generados podrían contribuir con las diferencias observadas después de la exposición al compuesto padre y al metabolito.

En resumen, el DEHP es un compuesto plastificante que se incluye en una gran variedad de productos, por lo que es considerado un compuesto tóxico emergente de relevancia en el sector salud, y aunque se ha encontrado en el polvo de casas y en dispositivos médicos para el tratamiento de enfermedades pulmonares, la vía inhalatoria no es tomada como una vía relevante y el DEHP y su metabolito MEHP no son considerados como compuestos neumotóxicos. A pesar de esto, en este estudio se observó que concentraciones ambientalmente relevantes de ambos ftalatos pueden ejercer efectos negativos sobre las células alveolares, como son las células A549, las cuales son representativas de los neumocitos tipo II que son las células que mantienen la homeóstasis a nivel alveolar. Se observó que estos ftalatos incrementaron la capacidad de las células de proliferar y migrar, además de observarse la presencia de cambios morfológicos tipo fibroblastos; adicionalmente fueron capaces de ejercer una pérdida en marcadores epiteliales (proteínas del surfactante: SP-B y SP-C y E-cadherina) y la expresión de un marcador mesenquimal como es la fibronectina. Finalmente, se observó que los ftalatos tienen la capacidad de alterar la expresión de genes de factores de crecimiento como el *PDGF*. En general, nuestros resultados sugieren que la exposición ambiental a DEHP y MEHP podrían tener un efecto a largo plazo en el pulmón, incrementando la probabilidad de padecer enfermedades pulmonares, a nivel del desarrollo y en la vida adulta, debido a que la EMT se encuentra activa a lo largo de la vida y tiene relevancia en los procesos de respuesta inflamatoria. De igual manera, una activación constante de procesos inflamatorios, por lo tanto de la EMT, también está vinculada a procesos patológicos en los que la inflamación tiene un papel importante. Sabemos que el MEHP puede desencadenar procesos inflamatorios lo que reforzaría la hipótesis de que DEHP y MEHP podrían contribuir a la aparición y mal pronóstico de enfermedades pulmonares, entre ellas el SDRA, BPD, fibrosis y cáncer. En la figura 22 se presenta el modelo para resumir los efectos que el DEHP y MEHP presentaron en las células A549.

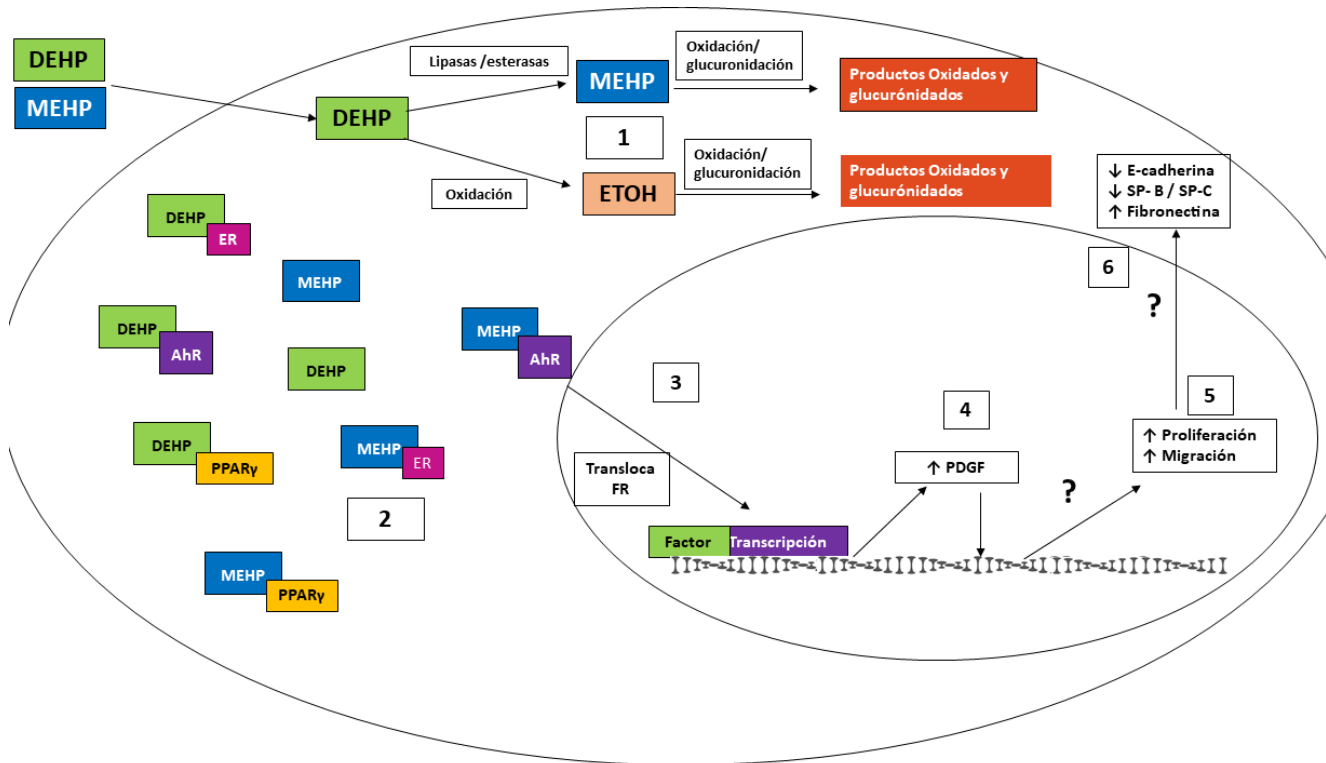


Figura 22 Mecanismos de acción del DEHP y MEHP en las células A549. El DEHP y el MEHP por su carácter lipofílico atraviesan la membrana celular; en el interior de la célula, el DEHP es metabolizado por las lipasas a su metabolito principal el MEHP y por hidrólisis o conjugación a otros metabolitos (1). Se ha reportado que el DEHP y MEHP se unen a varios receptores (2), como el receptor proliferador de peroxisomas (PPAR γ), el receptor aril hidrocarburo (AhR) y el receptor a estrógenos (ER α), los cuáles pueden fungir como factores de transcripción (3) y permitir la transcripción de los factores de crecimiento como el *PDGF* (4). Esto puede inducir el incremento en la proliferación celular, además del incremento en la migración celular (5) que podrían deberse a la transcripción de genes implicados en la pérdida de la polaridad celular, manifestada por la disminución de E-cadherina, surfactante y fibronectina (6).

5. CONCLUSIONES

1. El DEHP y su metabolito el MEHP presentaron citotoxicidad a concentraciones altas en las células A549, siendo el MEHP más citotóxico.
2. El DEHP incrementó la proliferación celular en todas las concentraciones y a los dos tiempos (24 y 48 h), mientras que el metabolito MEHP presentó un efecto dual: un efecto de proliferación a concentraciones bajas y un efecto citotóxico a concentraciones altas.
3. Ambos ftalatos incrementaron la migración celular de manera concentración- y tiempo-dependiente.
4. Los dos ftalatos indujeron cambios morfológicos en las células (alargamiento celular), sugiriendo un cambio en el fenotipo (tipo-fibroblasto).
5. El DEHP y MEHP disminuyeron proteínas de fenotipo epitelial (surfactantes: SP-B, SP-C y E-cadherina).
6. El DEHP y MEHP incrementaron la expresión de la proteína de fenotipo mesénquima (fibronectina).
7. El DEHP disminuyó los niveles de expresión del *PDGF* y el MEHP los incrementó, esto sugiere que los dos ftalatos tienen mecanismos de toxicidad diferentes, o que otros metabolitos del DEHP participan en su toxicidad.
8. En general, el metabolito MEHP presentó efectos tóxicos más marcados que el DEHP, lo que sugiere que pueden presentar mecanismos diferentes de acción.
9. Concentraciones ambientalmente relevantes de ambos ftalatos pueden ejercer efectos negativos sobre las células alveolares, presentando efectos pneumotóxicos que pudieran promover la aparición de enfermedades.

6. PERSPECTIVAS

1. Evaluar los efectos de la exposición al DEHP y MEHP sobre más proteínas de la EMT en las células A549, para confirmar la presencia de esta transición.
2. Evaluar los efectos del antagonista del PDGF para evaluar su participación en los mecanismos de acción del DEHP y MEHP sobre la proliferación y migración celular.
3. Realizar ensayos con el antagonista del TGF β para evaluar esta vía como posible mecanismo de toxicidad del DEHP y MEHP en la migración y cambio del fenotipo celular.
4. Evaluar la participación del receptor a estrógenos (ER) como mecanismos de toxicidad del DEHP en las células A549.
5. Evaluar la presencia de proteínas de las células alargadas para confirmar la EMT en estas estructuras.
6. Realizar una exposición inhalatoria al DEHP y MEHP en modelos *in vivo*, evaluando las estructuras y proteínas de la EMT para confirmar los efectos observados en las células A549.

7. REFERENCIAS

1. Abcam indirect flow cytometry protocol 2015: Available at: <http://www.abcam.com/protocols/indirect-flow-cytometry-protocol>
2. Abman (2001). Bronchopulmonary Dysplasia: "A Vascular Hypothesis". *Am J Respir Crit Care Med*, 164(10), 1755-1756.
3. Albro (1986). Absorption, Metabolism, and Excretion of Di (2-ethylhexyl) Phthalate by Rats and Mice. *Environ Health Perspect*, 65, 293-298.
4. Albro et al. (1973) Metabolism of diethylhexyl phthalate by rats: isolation and characterization of the urinary metabolites. *J Chromatogr*, 76(2), 321-330.
5. Albro & Lavenhar (1989). Metabolism of di (2 [ethylhexyl) phthalate. *Drug Metab Rev*, 21(1), 13-34.
6. Antoniades et al. (1987) *Oncogenes, Genes and Growth Factors*, ed. Guroff, G. (Wiley, New York), páginas 1-40
7. ATSDR (1995). Toxicological profile for Di(2-Ethylhexyl) Phthalate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of health and human services public health service. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.html>.
8. ATSDR (2002). Toxicological profile for Di(2-Ethylhexyl) Phthalate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of health and human services public health service. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.html>.
9. ATSDR (2012). Diethylhexyl Phthalate (DEHP) (CAS No. 117-81-7)
10. Baatz et al. (1990). Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. *Biochemistry*, 29(28), 6714-6720.
11. Barlett & Stirling (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 226, 3-6.
12. Barr et al. (2003). Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ Health Perspect*, 111(9), 1148.
13. Barrandon & Green (1987). Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor- α and epidermal growth factor. *Cell*, 50(7), 1131-1137.
14. Beers & Fisher AB (1992). Surfactant protein C: a review of its unique properties and metabolism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 263(2), 151-160.
15. Beers & Lomax (1995). Synthesis and processing of hydrophobic surfactant protein C by isolated rat type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 269(6), 744-753.
16. Beers et al. (1998). Synthetic Processing of Surfactant Protein C by Alveolar Epithelial Cells. The COOH terminus of pro SP-C is required for post-translational targeting and proteolysis. *J Biol Chem*, 273(24), 15287-15293.
17. Biberoglu & Biberoglu (2014). Capítulo 18-Prevention of Endometriosis. En: *Endometriosis*. Springer, Tokyo. pp. 277-310.
18. Bond et al. (1959). Proliferative potentials of bone marrow and blood cells studied by in vitro uptake of H³-thymidine. *Acta haematol*, 21(1), 1-15.
19. Bonner et al. (1998). Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 19(4), 672-680.
20. Bonner (2004). Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(4), 255-273.
21. Boström et al. (1996). PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*, 85(6), 863-873.

22. Burgess (2005). PPAR γ agonists inhibit TGF- β induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288, 1146- 1153.
23. Bustamante et al. (2001). Ftalatos y efectos en la salud. *Rev Int Conta Ambient*, 17(4).
24. Bustamante-Montes et al. (2004). Exposición infantil a plastificantes potencialmente tóxicos en productos de uso oral. *Salud Pública Méx*, 46(6), 501-508.
25. Carmichael et al. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47(4), 936-942.
26. Chen et al. (2018). Phthalate exposure promotes chemotherapeutic drug resistance in colon cancer cells. *Oncotarget*, 9(17), 13167.
27. Chinoy (2003). Lung growth and development. *Front Biosci*, 8, 392-415.
28. Clewell et al. (2010). Assessing the relevance of in vitro measures of phthalate inhibition of steroidogenesis for in vivo response. *Toxicology in vitro*, 24(1), 327-334.
29. Compennolle et al. (2002). Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*, 8(7), 702- 710.
30. Corea-Téllez et al. (2008). Estimated risks of water and saliva contamination by phthalate diffusion from plasticized polyvinyl chloride. *J Environ Health*, 71(3), 34-39.
31. Dalgaard et al. (2001). The acute effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats. *Toxicol Lett* 122, 69-79.
32. Desvergne et al. (2009). PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic?. *Mol Cell Endocrinol*, 304(1-2), 43-48.
33. ECB (2006), European Chemicals Bureau- Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Risk Assessment, Draft of March 2006. European Communities, European Chemicals Bureau
34. ECB (2008), European Chemicals Bureau – Existing Chemicals: <http://ecb.jrc.it>
35. Ema et al. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Nati Acad Sci U S A*, 94(9), 4273-4278.
36. EPA (2012). Agencia de Protección Ambiental DEHP: 1981; 1979
37. EPA (2017). Agencia de Protección Ambiental DEHP: 1981; 1979
38. Erkekoglu et al. (2010). Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di (2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicol Appl Pharmacol*, 248(1), 52-62.
39. Fajas et al. (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. *J Biol Chem*, 272, 18779- 18789.
40. Fehrenbach (2001) Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res*, 2(1), 33-46.
41. Feoktistova et al. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016 (4) pdb.prot087379.
42. Fehrenbach et al. (1999). Differential immunolocalization of VEGF in rat and human adult lung, and in experimental rat lung fibrosis: light, fluorescence, and electron microscopy. *Anat Rec*, 254(1), 61-73.
43. Foster et al. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res*, 243(2), 359-366.

44. Fotakis & Timbrell (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol lett*, 160(2), 171-177.
45. Frederiksen et al. (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr. Food Res*, 899-911.
46. Gavrilescu et al. (2015) Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *N Biotechnol*, 32(1), 147-156.
47. Gobran & Rooney (2001). Regulation of SP-B and SP-C secretion in rat type II cells in primary culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281(6), 1413-1419.
48. Gross et al. (2001). Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem*, 276(49), 46460-46468.
49. Hanahan & Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
50. Hanahan & Weinberg (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
51. Haarmann-Stemmann et al. (2009). Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochem Pharmacol*, 77(4), 508-520.
52. Hartl & Griese (2006). Surfactant protein in human lung diseases. *Eur J Clin Invest*, 36(6), 423-435.
53. Hiragun et al. (1998). A fibrogenic cytokine, platelet-derived growth factor (PDGF), enhances mast cell growth indirectly via a SCF-and fibroblast-dependent pathway. *J Invest Dermatol*, 111(2), 213-217.
54. HSDB. Hazardous Substance Data Bank. (1994). National Library of Medicine. National Toxicology Information Program. Bethesda, MD, USA. Disponible en : http://www.nicnas.gov.au/industry/existing_chemicals/phthalate_hazard_assessments/d_ehp%20hazard%20assessment%2030-4-07.pdf
55. Ikeda et al. (1980). Comparative Distribution, Excretion and metabolism of Di- (2-Ethylhexyl) Phthalate in rats, dogs and minature pigs. *Food Cosmet. Toxicol.* 18, 637-642.
56. INE (2012). Instituto Nacional de Ecología: Mendoza- Cantú: Ftalatos; Capítulo 5. Listado adicional al Convenio de Estocolmo: Sustancias de uso industrial: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/447/cap5.html>
57. Ito et al. (2005). Species differences in the metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol*, 79(3), 147-154.
58. Janér et al. (2007). Pulmonary endostatin perinatally and in lung injury of the newborn infant. *Pediatrics*, 119(1), 241-246.
59. Kalina et al. (1992). Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6(6), 594-600.
60. Kalluri & Weinberg (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420- 1428
61. Kalluri & Neilson (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 112(12), 1776-1784.
62. Kasahara et al. (2000). Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*, 106(11), 1311-1319.
63. Kim et al. (2007). Transforming growth factor β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells. *J Korean Med Sci*, 22(5), 898-904.

64. Kim et al. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *PNAS*, 103(35), 13180-13185.
65. Kirby et al. (1983). Evaluation of di(2-ethylhexyl) phthalate and its major metabolites in the Ames test and L5178Y mouse lymphoma mutagenicity assay. *Environ Mutagen*, 657-663.
66. Koch et al. (2005). New metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol*, 79, 367–376.
67. Kolarik et al. (2008). The association between Phthalates in Dust and Allergic Diseases among Bulgarian Children. *Environ Health Perspect*, 116, 98-103.
68. König & Guy (2014). Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants managed with non-invasive ventilation or surfactant and a brief period of mechanical ventilation: a 6-year cohort study. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 27(6), 608-611.
69. Koop et al. (1999). A scientific evaluation of health effects of two plasticizers used in medical devices and toys: A report from the American Council on Science and Health. *Med Gen Med*, 14. Disponible en: <http://www.medscape.com/Medscape/GeneralMedicine/journal/1999/v01.n06/mgm0622.koop/mgm0622.koop-01.html>
70. Latini et al. (2003). Exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate in humans during pregnancy. *Neonatology*, 83(1), 22-24.
71. Lindahl et al. (1997). Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development*, 124(20), 3943-3953.
72. Liu et al. (2008). Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases transforming growth factor- β 1 expression in fetal mouse genital tubercles. *J Toxicol Environ Health*, 71(19), 1289-1294.
73. Lovekamp-Swan & Davis (2003). Mechanisms of Phthalate Ester Toxicity in the Female Reproductive System. *Environ Health Perspect*, 111, 139-145.
74. Ma et al. (2012). Di-2-ethylhexyl phthalate and its metabolite single-ethylhexyl phthalate affect TGF-beta 1 expression and telomerase activity in the testis of young male rats. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 18(9), 783-788.
75. Magliozzi et al. (2003). Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem Cell Biol*, 120(1), 41-49.
76. Miller & Marty (2010). Impact of environmental chemicals on lung development. *Environ Health Perspect*, 118(8), 1155-1164.
77. Net et al. (2015). Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Sci Total Environ*, 515, 162-180.
78. Oie et al. (1997). Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. *Environ Health Perspect*, 105(9), 972- 978.
79. Park et al. (1998). FGF-10 is a chemotactic factor for distal epithelial buds during lung development. *Dev Biol*, 201(2), 125-134.
80. Patel et al. (2005). Differential modulation of COX-2 expression in A549 airway epithelial cells by structurally distinct PPAR γ agonists: evidence for disparate functional effects which are independent of NF- κ B and PPAR γ . *Cell Signal*, 17, 2098-1110.
81. Pearlstein et al. (1980). Fibronectin: a review of its structure and biological activity. *Mol Cell Biochem*, 29(2), 103-128.

82. Peters et al. (1994). Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J*, 13(14), 3296-3301.
83. Reinsberg et al. (2009). Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 239, 116-123.
84. Richburg & Boekelheide (1996). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 137, 42-50.
85. Ricote et al. (1998). The peroxisome proliferator- activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 79-82
86. Rodriguez et al. (2005). Wound-healing assay. En: Cell Migration. Humana Press. pp. 23-29.
87. Rooney et al. (1994). Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J*, 8(12), 957-967.
88. Rosicarelli & Stefanini (2009). DEHP effects on histology and cell proliferation in lung of newborn rats. *Histochem Cell Biol*, 131(4), 491-500.
89. Roth et al. (1988). Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. *Eur J Pediatr*, 147(1), 41-46
90. Selman (2016). Cigarette smoke enhances the expression of profibrotic molecules in alveolar epithelial cells. *PLoS one*, 11(3).
91. Selman & Pardo (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*, 3(4), 364-372.
92. Shi et al. (2007). Lung Development and Adult Lung Diseases. *Chest* 132 651-656.
93. Silva et al. (2003). Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol* 77, 561-567.
94. Simon & Mariani (2007). Role of PPARs and Retinoid X Receptors in the Regulation of Lung Maturation and Development. *PPAR Res*, 2007, 1-8.
95. Simon et al. (2006). Epithelial cell PPAR γ contributes to normal lung maturation. *FASEB J*, 10, 1507- 1509.
96. Tickner et al. (2001) Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review. *Am J Ind Med*, 39(1), 100-111.
97. Tomita et al. (1982). Mutagenic/Carcinogenic Potential of DEHP and MEHP. *Environ Health Perspect*, 45, 119-125.
98. Tomita et al. (1988). Fetotoxic Effects of Mono-2-ethylhexyl Phthalate (MEHP) in Mice. *Environ Health Perspect*, 65, 249-254.
99. Uauy et al. (2000). Molecular nutrition: regulation of lipid metabolism by peroxisome proliferator activated receptors (PPAR). Their relationship to obesity and diabetes mellitus. *Rev. méd. Chile*, 128, 437-446.
100. Van Roy & Berx (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65(23), 3756-3788.
101. Wang et al. (2017). Up regulation of IL-6 is involved in di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induced migration and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Biomed Pharmacother*, 89, 1037-1044.
102. Warburton et al. (2005) Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Resp*, 57, 26R-37R.

103. Weaver & Conkright (2001). Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol*, 63(1), 555-578.
104. Willis & Borok (2007). TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293(3), L525-L534.
105. Wu et al. (2018). Plasticizer di-(2-ethylhexyl) phthalate induces epithelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis in vitro and in vivo. *Toxicol Sci*,
106. Wu et al. (2013). Emerging roles of PDGF-D in EMT progression during tumorigenesis. *Cancer Treat Rev*, 39(6), 640-646.

8. APÉNDICE

8.1 Expresión del PPAR y AhR por exposición al DEHP y MEHP

Los receptores PPAR y AhR pertenecen a la superfamilias de receptores nucleares, es decir tienen la capacidad de unirse a su agonista y fungir como factores de transcripción. En el caso del PPAR se conocen 3 isoformas denominadas α , β/δ y γ , y su papel en las células es diverso. En el pulmón se encuentran principalmente las isoformas α y en mayor proporción la isoforma γ (Fajas et al., 1997; Ricote et al., 1998; Uauy et al., 2000; Patel et al., 2005). El PPAR γ está implicado en varias funciones en el pulmón entre ellas la maduración pulmonar. Simon et al. (2006) observaron un alargamiento de los espacios aéreos (zona de intercambio gaseoso) en ratones con el gen *PPAR γ* suprimido, lo que tuvo como resultado una maduración insuficiente en la etapa postnatal; este crecimiento estaba acompañado de alteraciones en la fisiología del pulmón, incluyendo una alteración en los volúmenes pulmonares (disminución en la resistencia del tejido o impedancia, aumentos en la capacidad pulmonar total, capacidad inspiratoria y capacidad vital) y una disminución en la resistencia del tejido, lo cual sugiere que el PPAR γ es importante en la fisiología del pulmón. Ricote et al., 1998; Xin et al., 1999 Burgess et al., 2005; Simon et al., 2006; Simon & Mariani, 2007).

Por otra parte, el receptor aril hidrocarburo (AhR) al igual que el PPAR es un regulador transcripcional, altamente expresado en varios tipos celulares, entre ellos el pulmón, se encuentra localizado predominantemente en citoplasma y puede unirse a varios tipos de ligando preferentemente de estructura plana, y fungir como un factor de transcripción. Tiene Para evaluar si estos ftalatos tienen la capacidad de inducir la expresión de PPAR γ y AhR en las células A549 se llevó a cabo la evaluación de la expresión de ambos receptores. La metodología está descrita en el punto 2.6.

Tabla 5. Sondas TAQMAN para los genes PPAR γ y AhR.

Sonda	Marcador	Catálogo #
PPAR γ	FAM-MGB	Hs01115513_m1
AhR	FAM-MGB	Hs00169233_m1

8.1.1 Expresión del PPAR γ en las células A549

Los ensayos de expresión del PPAR γ se realizaron mediante la cuantificación del mRNA. En la fig 23 se presentan los efectos de la troglitazona (agonista del PPAR γ) a distintos tiempos de 6, 8, 12 y 24 h. Se observó una tendencia ($p < 0.0001$) a incrementar la expresión del mRNA en las células A549, siendo la expresión más alta las 24 h de exposición. El $\Delta\Delta Ct$ fue de 1.8 ± 0.5 , no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto al control.

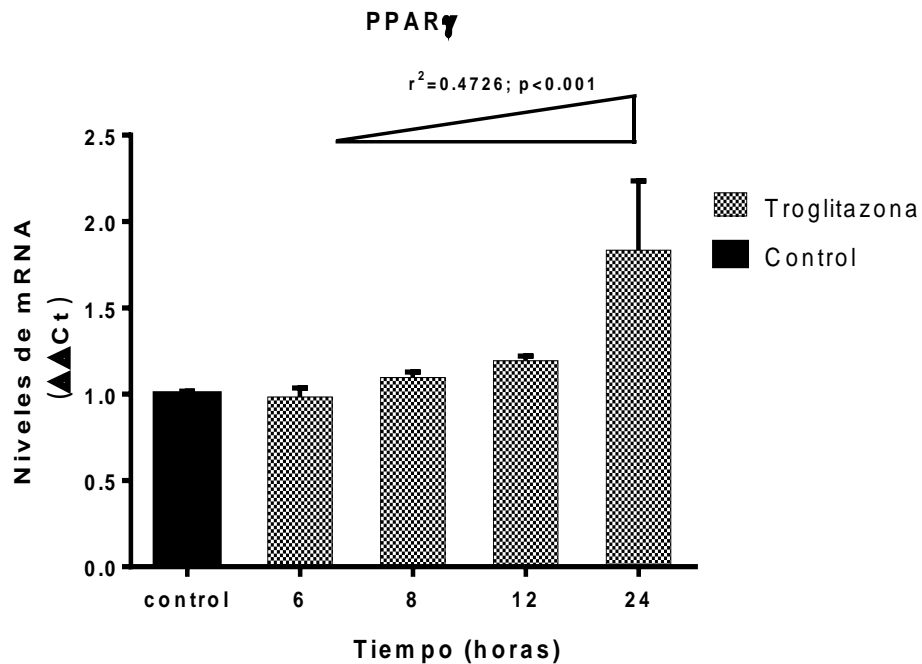


Figura 23. Expresión del PPAR γ por incubación con troglitazona ($\Delta\Delta Ct$). Se presenta la media \pm EE. Densidad 50,000 células/cm². Se presentan los datos de 3 experimentos independientes por triplicado. Troglitazona (1.5 mM). Kruskal-Wallis y *post-hoc* Dunn. $p > 0.05$ con respecto al control. Prueba de tendencia * $p < 0.001$.

8.1.2 Expresión del PPAR γ en células A549 expuestas a DEHP y MEHP

Se evaluó la expresión del PPAR γ por la exposición al DEHP a las concentraciones de 1, 10 y 100 μM a las 24 h. En la fig. 24 se muestra el efecto en el cambio de expresión del PPAR γ ($\Delta\Delta Ct$) con respecto al control. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en la expresión del mRNA con respecto al control.

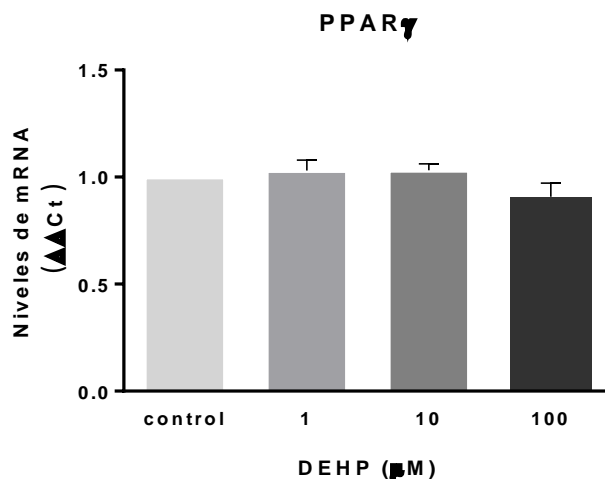


Figura 24. Expresión del PPAR γ en células A549 expuestas al DEHP ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Se presenta la media \pm EE. Densidad 50,000 células/cm² de la exposición a las concentraciones del DEHP (1, 10 y 100 μM). Se presenta la media \pm EE de 3 experimentos independientes por triplicado. Kruskal-Wallis y *post-hoc* Dunn. $p > 0.05$ con respecto al control. $p > 0.05$

En relación con la exposición al MEHP, Se realizó la cuantificación del mRNA del PPAR γ mediante la técnica de RT-PCR. En la figura 25 se presentan los niveles del mRNA del PPAR γ evaluado mediante el $\Delta\Delta\text{Ct}$ a las concentraciones de 1, 10 y 50 μM de MEHP a las 24 h. Se observó un ligero incremento en la concentración más alta (50 μM) con una media de 1.3 ± 0.3 , sin embargo, no fue significativo.

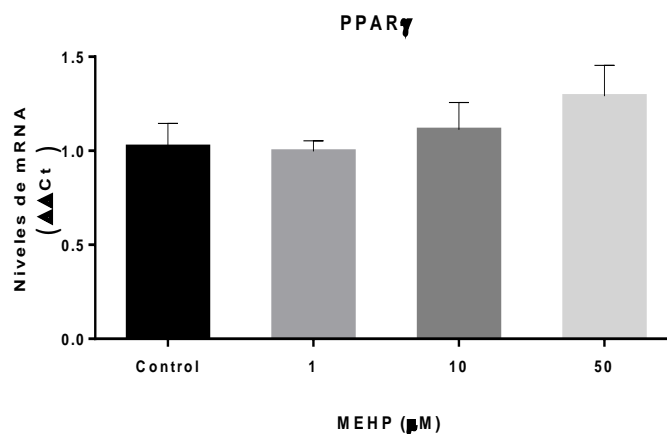


Figura 25. Expresión del PPAR γ por exposición al MEHP ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Células A549 en una densidad de 50,000 células/cm² se incubaron con 1, 10 y 50 μM de MEHP por 24 h. Se presenta la media \pm EE de 3 experimentos independientes por triplicado. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) respecto al control. Kruskal-Wallis y *post-hoc* Dunn.

8.1.3 Expresión del PPAR γ por el co-tratamiento con ácido retinoico

Debido a que no observamos diferencias en la expresión del mRNA del PPAR γ y se ha reportado que para su transcripción se lleva a cabo la formación de un hetero dímero obligado entre el PPAR γ y el receptor RXR se realizó el co- tratamiento con ácido retinoico (activador del RXR) para comprobar que este no era limitante para la cuantificación del mRNA del PPAR γ . En la fig 26 se presentan los efectos de la troglitazona (agonista del PPAR γ) y el co-tratamiento con el ácido retinoico (agonista de la vía RXR) a las 24 h, además de un co-tratamiento con el antagonista del PPAR γ (GW9662). No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con la troglitazona, el co-tratamiento troglitazona y ácido retinoico, el co-tratamiento con troglitazona, ácido retinoico y GW9662 con respecto al control ($p > 0.05$).

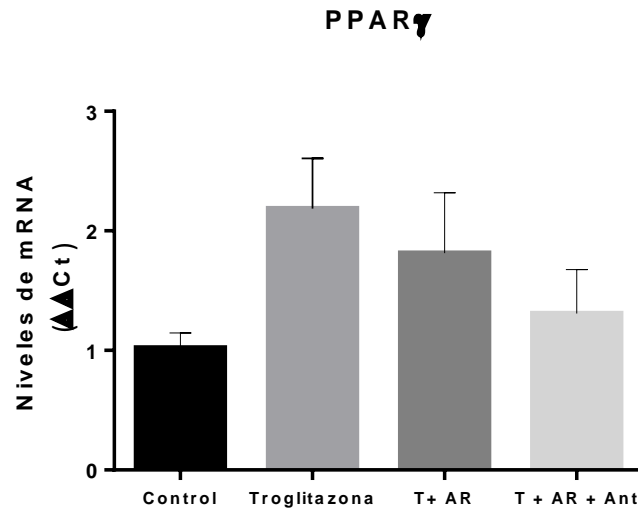


Figura 26. Expresión del PPAR γ con el co- tratamiento con troglitazona y ácido retinoico ($\Delta\Delta Ct$). Células A549 en una densidad de 50,000 células/cm² se incubaron con los diferentes tratamientos por 24 h. Se presenta la media \pm EE. Se presentan 3 experimentos independientes. Troglitazona (1.5 mM); AR=Ácido retinoico (3 μ M); Ant=antagonista GW9662 (2.5 μ M). Kruskal-Wallis y *post-hoc* Dunn. $p > 0.05$ con respecto al control.

8.1.4 Expresión del AhR por exposición al DEHP y MEHP

El DEHP puede unirse a varios receptores, entre ellos al AhR e inducir proliferación (Hsie et al., 2012), por lo que se realizó la cuantificación del mRNA ($\Delta\Delta Ct$) después de la exposición a DEHP (1, 10 y 100 μ M) por 24 h (Fig. 27a). Se observó un incremento en los niveles del mRNA, siendo significativa a la concentración más alta de 100 μ M ($p < 0.05$).

Por otro lado, el metabolito MEHP también tiene la capacidad de unirse al AhR, por lo que se cuantificó la expresión del receptor en las células A549 expuestas a 1, 10 y 50 μM por 24 h. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión del receptor a la concentración más baja (1 μM) y un posterior incremento a las concentraciones de 10 y 50 μM (Fig. 27b); aunque este no fue significativo.

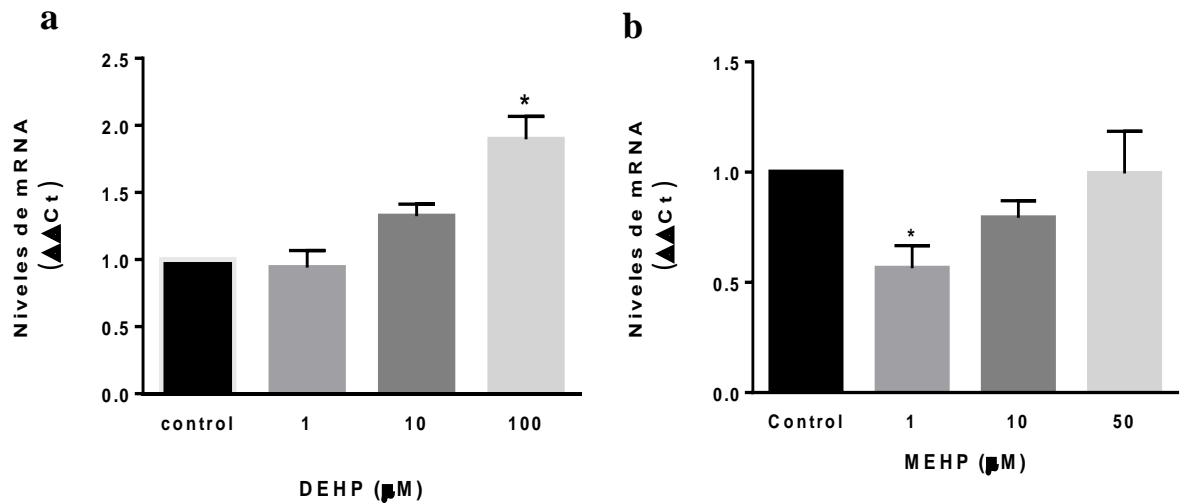


Figura 27. Expresión del AhR por exposición a los ftalatos ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Se evaluó la exposición de DEHP a 1, 10 y 100 μM (fig 18a) y a MEHP a 1, 10 y 50 μM (fig 18 b). Densidad 50,000 células/ cm^2 . Se presenta la media \pm EE del parámetro $\Delta\Delta\text{Ct}$ de 3 experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$ con respecto al control. Kruskal-Wallis y *post-hoc* Dunn.