



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN GÉNICA DE
ENZIMAS ANTIOXIDANTES (SOD, GPX, GST, GR Y CAT) COMO
BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A FTALATOS EN CULTIVO
CELULAR.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

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

P r e s e n t a

Elizabeth Brassea Pérez

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 16:00 horas del día 08 del Mes de diciembre del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación de la actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes (SOD, GPX, GST, GR y CAT) como biomarcadores de exposición a ftalatos en cultivo celular"

Presentada por el alumno:

Elizabeth Brassea Pérez

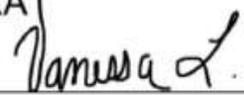
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

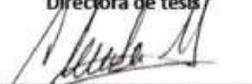
LA COMISIÓN REVISORA



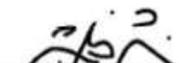
Dra. Tania Zenteno Saín
Directora de tesis



Dra. Vanessa Labrada Martagón
Co-Tutora



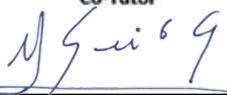
Dra. Claudia Janetl Hernández-Camacho
Co-Tutora



Dr. Ramón Gaxiola Robles
Co-Tutor



Dr. José Pablo Vázquez Medina
Co-Tutor



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 04 de diciembre de 2023.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante –Elizabeth Brassea Pérez- del Programa de Doctorado en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas
Excluir bibliografías
- Porcentajes de similitud:
Máximo 20% para tesis Posgrado
Se muestra captura de pantalla



CAT) COMO Citas excluidas Bibliografía excluida **12%** SIMILAR

Resumen de Coincidencias 139 coincidencias

1	Internet 1902 palabras Copiado el 20-Oct-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx	5%
2	Internet 220 palabras Copiado el 08-Ago-2023 pdffox.com	1%
3	Internet 164 palabras hdl.handle.net	<1%
4	Internet 134 palabras Copiado el 03-Oct-2022 cicese.repositorioinstitucional.mx	<1%
5	Internet 130 palabras Copiado el 09-Feb-2023 www.researchgate.net	<1%
6	Internet 110 palabras Copiado el 10-Nov-2023 s6250e2cbcd1c88c4.jimcontent.com	<1%
7	Internet 109 palabras eprints.uanl.mx	<1%

Firmas del Comité



Dra. Tania Zentero Savín



Dra. Vanessa Labrada
Martagón



Dra. Claudia Janetl
Hernández-Camacho



Dr. Ramón Gaxiola Robles



Dr. José Pablo
Vázquez Medina

Conformación de Comités

Comité Tutorial

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

Dr. Ramón Gaxiola-Robles
Hospital General de Zona No.1
Instituto Mexicano del Seguro Social
Co-Tutor de Tesis

Dra. Vanessa Labrada-Martagón
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Co-Tutora de Tesis

Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho
Laboratorio de Ecología de Pinípedos
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional
Co-Tutora de Tesis

Dr. José Pablo Vázquez-Medina
Department of Integrative Biology
University of California, Berkeley
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Tania Zenteno-Savín
Dr. Ramón Gaxiola-Robles
Dra. Vanessa Labrada-Martagón
Dra. Claudia Janetl Hernández-Camacho
Dr. José Pablo Vázquez- Medina

Jurado de Examen

Dra. Tania Zenteno-Savín
Dr. Ramón Gaxiola-Robles
Dra. Vanessa Labrada-Martagón
Dra. Claudia Janetl Hernández-Camacho
Dr. José Pablo Vázquez- Medina

Suplentes

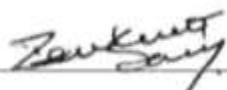
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Resumen

El plastificante bis(2-etilhexilo) ftalato (DEHP) altera el equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y las defensas antioxidantes. A pesar de la información disponible sobre los efectos tóxicos del DEHP en organismos modelo, la respuesta celular al DEHP en especies naturalmente adaptadas para tolerar el estrés oxidativo aún no se ha explorado. Los mamíferos marinos están naturalmente adaptados para hacer frente al estrés oxidativo derivado de la isquemia/reperfusión inducida por el buceo. El objetivo de este estudio fue comparar los cambios en los indicadores de estrés oxidativo asociados al DEHP en células de músculo esquelético de humanos (*Homo sapiens sapiens*) y lobos marinos de California (*Zalophus californianus*). Se recolectaron muestras de músculo abdominal de mujeres sanas sometidas a cesárea programada, tras obtener su consentimiento informado. Las muestras de músculo de lobo marino se obtuvieron de crías encontradas recientemente muertas en la colonia de Los Islotes, Golfo de California. Las células de músculo esquelético se aislaron y cultivaron en condiciones estándar. Las células se dividieron en dos grupos. Un grupo fue expuesto a DEHP (1 mM) durante 13 días (n=25; exposición), el otro grupo se mantuvo bajo condiciones control, es decir sin DEHP añadido (n=25; control). Se midió la producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el daño oxidativo, la actividad de enzimas antioxidantes y la expresión génica mediante métodos espectrofotométricos y RT-qPCR. En células expuestas al DEHP la producción de $O_2^{\bullet-}$ y la actividad de superóxido dismutasa (SOD) fueron mayores que en las células bajo condiciones control para ambas especies. La actividad de glutatión S-transferasa (GST) y los niveles de carbonilos proteicos (PC) aumentaron significativamente en las células humanas expuestas a DEHP, y no significativamente en las células de lobo marino. Por el contrario, las actividades de glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) aumentaron significativamente en las células de lobo marino, pero no en las de humano expuestas a DEHP. Se observó una expresión diferencial de los genes implicados en el metabolismo redox entre las células control y expuestas a DEHP y entre especies. Los patrones de expresión de 26 y 19 genes fueron significativamente diferentes en las células humanas y de lobo marino, respectivamente, después de la exposición a DEHP. En las células humanas, la expresión de la *GST1* microsomal y la *GST* (κ , μ , ϑ , ω y z) fue mayor, mientras que la expresión de la 8-oxoguanina DNA glicosilasa (*OGG1*), la *CAT*, la *GR* y el factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (*NRF2*) fue menor, sugiriendo un aumento en los procesos de estrés oxidativo y de detoxificación de fase dos. En contraste, la expresión de *OGG1*, *NRF2*, *GPx2* y *SOD3* en las células de lobo marino fue mayor en células expuestas a DEHP que en células mantenidas bajo condiciones control, lo que sugiere que el DEHP activa las defensas antioxidantes en estas células, contribuyendo potencialmente a mantener la homeostasis redox y a evitar el daño oxidativo.

Palabras clave: Contaminantes emergentes, enzimas antioxidantes, estrés oxidativo, mamíferos, Una Salud

ORCID: 0000-0002-3334-610X



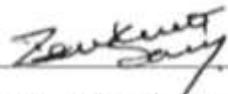
Vo.Bo. Dra. Tania Zenteno Savín
Directora de Tesis

Summary

The plasticizer bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) dysregulates the balance between reactive oxygen species production and antioxidant defenses. Despite the information available on DEHP's hazardous effects in model species, the cellular response to DEHP in organisms naturally adapted to tolerate oxidative stress remains unexplored. Marine mammals are naturally adapted to cope with oxidative stress derived from diving-induced ischemia/reperfusion. The objective of this study was to compare changes in oxidative stress indicators induced by DEHP in human (*Homo sapiens sapiens*) and California sea lion (*Zalophus californianus*) skeletal muscle cells. Abdominal muscle samples were collected from healthy women undergoing planned cesarean surgery at full term after obtaining informed consent. Sea lion muscle samples were obtained from recently deceased pups at Los Islotes rookery, Gulf of California. Skeletal muscle cells were isolated and cultured under standard conditions. Cells were divided into two groups. One group was exposed to 1 mM DEHP for 13 days (n=25; treatment), and the other served as a control (n=25; no DEHP). Superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) production, oxidative damage, antioxidant enzyme activities and gene expression were measured using spectrophotometric methods and RT-qPCR. DEHP exposure increased $O_2^{\bullet-}$ production and superoxide dismutase (SOD) activity in both species. While the activity of glutathione S-transferase (GST) and protein carbonyls (PC) levels significantly increased in human cells, these indicators showed a non-significant elevation in sea lion cells. In contrast, Glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities increased significantly in sea lion but not in human cultures exposed to DEHP. Genes involved in redox metabolism showed differential expression between culture conditions and species. DEHP exposure led to widespread modifications in gene expression patterns, with 26 and 19 differentially expressed genes in humans and sea lion cells, respectively. In human cells, DEHP increased microsomal *GST1* and *GST* (κ , μ , ϑ , ω , and ζ), while suppressing 8-oxoguanine DNA glycosylase (*OGG1*), *CAT*, *GR*, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*NRF2*) expression, suggesting increased oxidative stress and phase two detoxification processes. In contrast, DEHP increased *OGG1*, *NRF2*, *GPx2* and *SOD3* expression, suggesting that DEHP activates antioxidant defenses in sea lion cells, potentially contributing to maintain redox homeostasis and avoid oxidative damage.

Keywords: Antioxidant enzymes, emerging pollutants, mammals, One Health, oxidative stress.

ORCID: 0000-0002-3334-610X



Vo.Bo. Dra. Tania Zerteno Savin
Directora de Tesis

Dedicatoria

*A mi familia y esposo por ser mi mayor tesoro,
a mi regalo de Dios André,
Los amo de aquí a la luna y de regreso en pasitos de tardígrado*

*A la memoria de Ana azulita,
Ma. Enriqueta Pérez,
Francisco Brassea
y tata Pancho*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los apoyos económicos otorgados a través del proyecto 2016-01-2305 (Fronteras de la Ciencia) y la beca número 613207 de Doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos y a la academia de Biología Marina por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y apoyarme en el desarrollo de mi tesis durante estos cuatro años.

A la Comisión Nacional de Bioética (CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601) de México, con número de registro 2018-785-010 por aprobarnos la obtención de muestras de humano, así como al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), al Comité de Ética en Investigación y el Comité Hospitalario de Bioética (F-CNIC 2019-174 y R 2000-785-008) por su colaboración.

A la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) por facilitarnos el permiso de colecta número SGPA7DGV5708817/17 para muestras de pinnípedos.

A mis asesores por acompañarme durante esta aventura de 4 años, gracias por todo su tiempo y dedicación, por el conocimiento compartido y sus consejos. Dra. Tania, siempre le estaré agradecida por aquella llamada en 2019 para conocernos, gracias por mantener no solo las puertas de su cubículo abiertas, sino también sus brazos para apapacharme en los momentos de estrés (oxidativo y no oxidativo), gracias por aceptarme como su alumna, lo bien aprendido jamás se olvida y le prometo poner todo mi empeño para cumplir la meta de ser investigadora.

Dr. Gaxiola, creo que no lo empalago lo suficiente jajaja, pero aprovecho la oportunidad para decirle que usted es mi profesor estrella, lo quiero y aprecio mucho los retos intelectuales a los que me enfrenta, me mantienen vigente en el saber. PS cuando por fin quiera donar su colección de libros de estadística, ojalá se acuerde de mí (amalayón).

Dra. Claudia, quiero darle las gracias por todo su apoyo durante la realización de mi tesis, por toda su dedicación en el campo, sin su ayuda este trabajo estaría incompleto. Gracias por su cariño, su empatía, sus palabras bellas y alentadoras en cada avance de tesis, gracias por ser tan linda como es.

Dr. José Pablo, quiero agradecerle por todo su apoyo y asesoramiento durante la realización de mi tesis, pero también quiero darle profundamente las gracias por cada palabra de motivación al finalizar mis presentaciones de avances, parece poco, pero para una recién mamá, con todos los miedos que eso implicaba, “lo estás haciendo muy bien” hace una enorme diferencia, gracias por ese corazón de oro que comparte con todos.

Dra. Vanessa, el saber sin sustento estadístico, es como un huevo sin la temperatura adecuada para eclosionar. Quiero agradecerlo porque gracias a su labor, cada idea que nació del presente trabajo se desarrolló a la perfecta temperatura, eclosionó firme y fuerte, y ahora está lista para irse al mar del conocimiento científico. Gracias por ser la guía de tantas chelonias y lobos de mar que rondamos las aulas.

Orlando Lugo, muchas gracias por toda tu ayuda en el laboratorio, gracias por enseñarme desde cero las técnicas de cultivo celular y estimación de actividad enzimática, gracias por tu disposición, por todo el apoyo que me brindaste durante la realización de mi tesis y, sobre todo, gracias por tu amistad.

Mina Königsberg, Dios pone angelitos en nuestro camino para iluminarlo, para que sigamos dentro del sendero y darnos claridad en los momentos que la necesitamos. Yo sé que eres uno de esos angelitos a los que siempre podré recurrir, esos oídos que siempre estarán disponibles para escuchar y esas palabras que necesitamos escuchar las científicas en voz alta para aprender a reconocer nuestro propio valor. Gracias de todo corazón por ser mi mentora, mi amiga y en un futuro por qué no, colega <3.

Gracias Leo, Jaime, Amayrani, Isabel, Zury, Naye, Anabelle, Lumara, Denisse, Lupita y Eva por ser tan maravillosas personas en mi vida, por ustedes la frase “la medida del amor, es amar sin medida” tiene sentido y no importa si estamos lejos o cerca ustedes siempre están en mi corazón y mente.

A mi hermosa familia

A mis padres Dora y David, gracias por transmitirme la pasión por aprender, la curiosidad por descubrir y la paciencia para comprender. Gracias por siempre escucharme, por aconsejarme y sobre todo gracias por amarme tanto. Muchas gracias por toda su entrega, por cruzar el mar para venir a cuidar de su hermoso nieto André, gracias por apoyarnos a Ricardo y a mí para empezar el posgrado y una nueva vida juntos, sin la beca Brassea Pérez los primeros meses no lo habríamos conseguido, gracias por no dejar que le falte nada a mi bella familia de tres. Dios no se equivoca y me concedió llegar al mundo en los mejores brazos, con las mejores personas, en el mejor hogar, los amo con toda mi alma.

A mi hermana Dra. Renée Brassea, preciosa de mi corazón, al ser la mayor tuviste que ser un ejemplo para mí, un ejemplo de grandeza, admiración, amor, inteligencia y humildad. Alguna vez juraste “apartaré de ellos todo daño e injusticia” y lo has hecho, “viviré y practicaré mi arte de forma santa y pura” y lo has hecho, “en cualquier casa que entre, lo haré para bien de los enfermos”, y lo has hecho, “todo lo que vea y oiga en el ejercicio de mi profesión, [...] lo callaré y lo guardaré con secreto inviolable” y lo has hecho. No conozco a nadie con más respeto por la vida humana que tú y aprovecho estas líneas para decirte que has salvado mi vida más de una vez, en muchos sentidos distintos, te amo y

admiro tanto nene, tanto que doy gracias cada día de mi vida por ser tu hermana y que seas la madrina de nuestro hijo.

A mi hermano Edson, gracias por ponernos siempre en primer lugar a Renée y a mí, gracias por tenernos siempre presentes en tus oraciones y gracias por ser el mejor hermano mayor que uno pudiera tener, te amo con todo mi corazón.

A mi esposo Ricardo, amor mío gracias por darme el mayor regalo que la vida tiene para dar, gracias por André (y los hijos que Dios nos dé jijiji), gracias por todo el amor y apoyo que me brindas a manos llenas cada día. El universo se creó hace aproximadamente 13.6 mil millones de años, toda esa materia, todas esas partículas fueron constituyendo formas, estrellas, planetas y seres como tú y como yo. Se requirieron miles de millones de años de evolución para formarnos como seres humanos. Se requirieron millones de vidas, de coincidencias, momentos, historias y amor para que coincidiéramos tú y yo. Seguramente se requirieron miles de pruebas, pero se requirió solo un minuto para conocernos, pasaron solo dos semanas para ser amigos y un par de años para enamorarnos. Todo lo que he logrado en estos cuatro años ha sido gracias a que tú crees en mí y apoyas cada sueño e idea loca que genera esta cabecita. He desembarcado en más de 34 islas, pero solo una guardaba un gran tesoro, mi compañero de vida, te amo Ricardo Augusto Rodríguez Medina, con todas las letras, con toda la ternura, con todo el corazón.

A mi amado hijo André, regalo de Dios, divino tesoro de mi corazón gracias por llegar a mis brazos y dirigir con amor cada paso que doy. Gracias por llenar mis días de sonrisas, de vivencias nuevas, gracias por llenarme de ternura, cariño, asombro, por enternecer mis mañanas cuando despierto y veo tu dulce carita. Gracias a Dios por tu vida y tu salud, gracias por curar los malos ratos con un abrazo o con un beso, por hacerme más fuerte e impulsarme a volar más alto que nunca. Gracias por llegar a nuestras vidas dulce cariño nuestro. Papá y mamá te aman 3,000,000.

Por último y no menos importante, por ser el personaje estelar en la novela de mi vida, amigo y cómplice, Francisco Bressea Escalante, le agradezco en palabras de un gran hombre a otro, “[...] El hombre aún lleva impresa en su estructura corpórea la huella indeleble de su humilde origen” Charles Darwin. Así como yo llevo la huella de su fuerza y coraje en mi sangre y apellido D.E.P.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vii
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xv
Abreviaturas	xvii
Glosario	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Ftalatos o ésteres de ácido ftálico	4
2.1.1 Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y sus efectos en mamíferos	6
2.2 Estrés oxidativo	9
2.3 Músculo esquelético	14
2.3.1 Características del músculo esquelético de humano y lobo marino de California	15
2.3.2 Toxicidad del di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en músculo esquelético	16
2.4 Adaptación frente al estrés oxidativo: el buceo	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos particulares	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Extracción y aislamiento de tejido muscular	24
6.2 Cultivo de músculo esquelético	26
6.2.1 Viabilidad celular	27
6.3 Determinación de la concentración para exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) de cultivo primario de células musculares	28
6.4 Tamaño de muestra	29
6.5 Bioensayos de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) de células musculares en cultivo primario	29
6.5.1 Cambios en la morfología, proliferación y capacidad regenerativa de las células de músculo esquelético en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	30
6.5.2 Biomarcadores	31
6.5.2.1 Producción de especies reactivas y marcadores de daño oxidativo	32
6.5.2.1.1 Producción de radical superóxido	32
6.5.2.1.2 Peroxidación de lípidos	32
6.5.2.1.3 Carbonilos proteicos	33
6.5.2.2 Enzimas antioxidantes	33
6.5.2.2.1 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	33
6.5.2.2.2 Actividad de catalasa (CAT)	34
6.5.2.2.3 Actividad de glutatión-disulfuro reductasa (GR)	35

6.5.2.2.4 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)	35
6.5.2.2.5 Actividad de glutatión S-transferasa (GST)	36
6.5.2.3 Expresión génica de enzimas, genes de referencia y marcadores de muerte celular	36
6.5.2.3.1 Extracción de ARN	36
6.5.2.3.2 Purificación y retrotranscripción	36
6.5.2.3.3 Diseño de primers	37
6.5.2.3.4 PCR en tiempo real por transcripción inversa (RT-qPCR)	41
6.6 Análisis estadísticos	42
6.6.1 Proliferación celular y capacidad regenerativa	42
6.6.2 Indicadores de estrés oxidativo	44
6.6.3 Expresión génica	45
6.6.4 Evaluación de biomarcadores de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	45
6.6.5 Diferencias entre especies	47
7. RESULTADOS	48
7.1 Determinación de la dosis a utilizar en los bioensayos de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	48
7.2 Tamaño de muestra	49
7.3 Efectos de la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en cultivos primarios de músculo esquelético	49
7.3.1 Humano	49
7.3.2 Lobo marino de California	55
7.4 Producción de radical superóxido y marcadores de daño oxidativo	61
7.4.1 Humano	61
7.4.2 Lobo marino de California	61
7.5 Actividad de las enzimas antioxidantes	62
7.5.1 Humano	62
7.5.2 Lobo marino de California	64
7.6 Expresión génica de antioxidantes, marcadores de reparación del daño oxidativo, respuesta inflamatoria y muerte programada en células de músculo esquelético en cultivo primario en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	66
7.6.1 Humano	66
7.6.2 Lobo marino de California	69
7.7 Evaluación del índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	73
7.7.1 Humano	73
7.7.2 Lobo marino	74
7.8 Comparación entre especies	76
7.8.1 Actividad enzimática, producción de radical superóxido, niveles de daño oxidativo y perfil de transcripción entre especies	76
7.8.2 Análisis Discriminante Lineal (ADL)	80
8. DISCUSIÓN	82
8.1 Determinación de la dosis de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) para los bioensayos y su efecto en la viabilidad de células musculares	83

8.2 Efectos de la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en la morfología, regeneración y proliferación celular de células de músculo esquelético en cultivos primarios	83
8.3 Indicadores de estrés oxidativo y expresión génica	87
8.4 Evaluación del índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP).....	95
8.5 Comparación de la respuesta entre especies	96
9. CONCLUSIONES	98
10. LITERATURA CITADA	99
11. ANEXOS	119
Anexo A. Efectos de los ftalatos en tejidos de especies modelo	119
Anexo B. Consentimiento informado.....	125
Anexo C. Aprobación del proyecto por parte del IMSS.....	128
Anexo D. Mix de reacción y programa de amplificación por PCR punto final.	129
Anexo E. Artículo Publicado.- Oxidative stress induced by phthalates in mammals: State of the art and potential biomarkers.	130
Anexo F. Artículo Publicado.-DEHP exposure impairs human skeletal muscle cell proliferation in primary culture conditions: preliminary study.	142

Lista de figuras

- Figura 1.** Ftalatos considerados contaminantes prioritarios por su papel como disruptores endócrinos. En fuente itálica y negritas se muestran los valores correspondientes al peso molecular (g mol^{-1}) y solubilidad en agua (mg L^{-1}) de cada ftalato, respectivamente.4
- Figura 2.** Vías y factores determinantes de la absorción de xenobióticos en el humano. (+) Favorece la absorción; (-) reduce la absorción; (+/-) efecto indistinto; (Pgp) glucoproteína-P 1, proteína transportadora encargada de bombear agentes xenobióticos fuera de la célula. Modificado de Franklin (2015).5
- Figura 3.** Biotransformación del di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en mamíferos (Peck y Albro, 1982). Las reacciones metabólicas que se desarrollan durante la biotransformación se subdividen en la fase I, que incluye reacciones de funcionalización (p. ej., reacciones de óxido-reducción e hidrólisis), y la fase II, donde ocurren reacciones de conjugación (p. ej., glucuronidación y esterificación). El proceso biológico inicia con la transformación del DEHP a sus metabolitos y finaliza con la excreción de la mayor proporción de éstos. Altas concentraciones de ftalatos pueden comprometer la homeostasis del tejido provocando daño y estrés oxidativo en las células.8
- Figura 4.** Representación gráfica de la producción de especies reactivas al oxígeno (ERO) durante el ciclo de isquemia/reperfusión en una célula. O_2 , Oxígeno; AntiOx, antioxidantes; XO, xantina oxidasa; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; AMP, adenosín monofosfato; $\text{O}_2^{\bullet -}$, anión radical superóxido; T, bloquea.19
- Figura 5.** Representación gráfica del sistema muscular de (a) humano (*Homo sapiens sapiens*) y (b) lobo marino de California (*Zalophus californianus*) referente a la toma de muestras.25
- Figura 6.** Ejemplificación de los cambios en abundancia celular y parámetros estructurales observados en cultivos primarios de células musculares de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos a una concentración de 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) por 13 días. (a) Muestra la abundancia de células musculares en cultivo primario; (b) ejemplo de una célula satélite turgente en condiciones control; (c) deformación de la membrana donde puede apreciarse una pérdida de volumen con respecto a las células control, la apariencia de las células plasmolizadas es rugosa y en algunos casos pierden la capacidad de adherencia a la base de la caja de cultivo. (d) Representación gráfica de los cuerpos de estrés; se observan como pequeños gránulos en el citoplasma, principalmente rodeando al núcleo. (e) Representación gráfica de la pérdida de la integridad de la membrana nuclear en cultivos expuestos a DEHP. (f) Esquema de la evaluación de la confluencia celular, determinada considerando el porcentaje de cobertura celular en el área de superficie adherente de la caja de cultivo.30
- Figura 7.** Relación de la concentración teórica de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) disuelto (puntos negros) y la viabilidad celular (línea punteada naranja) utilizadas para establecer la concentración de DEHP a utilizar en los bioensayos de exposición de las células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en condiciones de cultivo primario.48
- Figura 8.** Tamaño muestral óptimo estimado a partir de un poder estadístico de 0.8 (Leongómez 2020), estimado para conocer el número óptimo de cultivos primarios para muestras de humanos (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*).49

- Figura 9.** Cambios morfológicos en cultivos primarios de células de músculo esquelético de humano expuestas por 13 días a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Todas las imágenes fueron tomadas a 20X y ampliadas para su apreciación. Las flechas negras (\leftrightarrow) indican los espacios entre grupos de células; las flechas blancas (\leftarrow) indican micelas o partículas, presumiblemente, de ftalato.51
- Figura 10.** Frecuencia absoluta de las células satélite en cultivos primarios de las células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP 1 mM) durante 13 días. (A) Datos correspondientes a los días 1-7 de bioensayo; (B) datos correspondientes a los días 8-13 de bioensayo; (***) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos color gris y negro en el gráfico representan datos atípicos y extremos, respectivamente.52
- Figura 11.** Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) y Nagelkerke pseudo R² representando el número total de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) estimadas en 25 cm² bajo condiciones de cultivo primario luego de 13 días de bioensayo bajo condiciones control (—) (•) y expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (---) (*). Las líneas representan los modelos lineales de regresión estimados, los cuales describen la asociación entre el número total de células y el tiempo de cultivo en células y sus correspondientes controles. Los puntos en el gráfico corresponden a los valores estimados por los modelos control y exposición a DEHP 1 mM junto a su error estándar (sombra gris).55
- Figura 12.** Cambios morfológicos en cultivos primarios de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestas por 13 días a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Todas las imágenes fueron tomadas a 20X y ampliadas para su apreciación. Las flechas negras (\leftrightarrow) indican los espacios entre grupos de células; las flechas blancas (\leftarrow) indican micelas o partículas, presumiblemente, de ftalato.57
- Figura 13.** Frecuencia absoluta de las células satélite presentes en los cultivos primarios de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP 1 mM) durante 13 días. (A) Datos correspondientes a los días 1-7 de bioensayo; (B) datos correspondientes a los días 8-13 de bioensayo; (***) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos color negro en el gráfico representan datos extremos.....58
- Figura 14.** Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) y Nagelkerke pseudo R² representando el número total de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) estimadas en 25 cm² bajo condiciones de cultivo primario luego de 13 días de bioensayo en condiciones control (—) (•) y en células expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (---) (*). Las líneas representan los modelos lineales de regresión estimados, los cuales describen la asociación entre el número total de células y el tiempo de cultivo y sus correspondientes controles. Los puntos en el gráfico corresponden a los valores estimados por los modelos control y exposición junto a su error estándar (sombra gris).60
- Figura 15.** Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, nanomoles por miligramo de proteína por minuto) y marcadores de daño oxidativo a lípidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS, nanomoles por miligramo de proteína) y a proteínas (carbonilos proteicos, CP, micromoles por miligramo de proteína) en cultivos primarios de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Las diferencias estadísticamente significativas

($p < 0.05$), mostradas en el gráfico, corresponden a la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos negros en el gráfico representan datos atípicos.....61

Figura 16. Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, nanomoles por miligramo de proteína por minuto) y marcadores de daño oxidativo a lípidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS, nanomoles por miligramo de proteína) y a proteínas (carbonilos proteicos, CP, micromoles por miligramo de proteína) en cultivos primarios de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), mostradas en el gráfico, corresponden a la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos negros en el gráfico representan datos atípicos.62

Figura 17. Actividad de las enzimas antioxidantes en cultivos primarios de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) expuestos durante 13 días a condiciones control y exposición a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP). (SOD) Superóxido dismutasa; (GPx) glutatión peroxidasa; (GST) glutatión S-transferasa; (GR) glutatión-disulfuro reductasa; (CAT) catalasa. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) corresponden a la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos negros en el gráfico representan datos atípicos.64

Figura 18. Actividad de las enzimas antioxidantes en cultivos primarios de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y exposición a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP). (SOD) Superóxido dismutasa; (GPx) glutatión peroxidasa; (GST) glutatión S-transferasa; (GR) glutatión-disulfuro reductasa; (CAT) catalasa. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) corresponden a la prueba de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. Los puntos negros en el gráfico representan datos atípicos.....66

Figura 19. Perfil transcripcional de genes que codifican para enzimas antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa; y PRDX, peroxirredoxina); factores de transcripción (PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; y NRF2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), marcador de reparación del daño oxidativo (OGG, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa), citocinas inflamatorias (IL, interleucinas) e indicadores de muerte celular programada (CASP, caspasa) en células de músculo esquelético de humanos (*Homo sapiens sapiens*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP). Los valores en el eje y se expresan como logaritmo en base 2 de la media de los valores normalizados de expresión (gen de referencia ACTB, actina beta). Las barras de color sólido representan a los genes que fueron significativamente ($p < 0.05$) sobreexpresados (verdes) o subexpresados (rojos) en los cultivos expuestos a DEHP; mientras que las barras blancas indican que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para un gen en particular, con base en la prueba de *Kruskal-Wallis*. La longitud de las barras indica la magnitud de la diferencia en la expresión de un gen de las muestras expuestas a DEHP con respecto al control, estimada como el cociente entre los valores de expresión de los cultivos expuestos a DEHP y los valores de expresión en las muestras control.68

Figura 20. Perfil transcripcional de genes que codifican para enzimas antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa; y PRDX, peroxirredoxina); factores de transcripción (PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; y NRF2, factor 2 relacionado con el factor nuclear

eritroide 2), marcador de reparación del daño oxidativo (OGG, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa), citocinas inflamatorias (IL, interleucinas) e indicadores de muerte celular programada (CASP, caspasa) en células de músculo esquelético de Lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP). Los valores en el eje y se expresan como logaritmo en base 2 de la media de los valores normalizados de expresión (gen de referencia GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Las barras de color sólido representan a los genes que fueron sobreexpresados (verdes) o subexpresados (rojos) en los cultivos expuestos a DEHP; mientras que las barras blancas indican que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para un gen en particular, acorde a la prueba de *Kruskal-Wallis*. La longitud de las barras indica la magnitud de la diferencia en la expresión de un gen de las muestras expuestas a DEHP con respecto al control, estimada como el cociente entre los valores de expresión de los cultivos expuestos a DEHP y los valores de expresión en las muestras control. 71

Figura 21. Representación gráfica de los marcadores seleccionados en el índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) para las células musculares de humano (*Homo sapiens sapiens*) bajo cultivo primario expuestas durante 13 días a condiciones control y a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato, (DEHP). Los puntos verdes resaltan aquellas variables que mostraron valores significativamente mayores de acuerdo con la prueba *Mann-Whitney-Wilcoxon* (secciones 7.4.1, 7.5.1 y 7.6.1). 74

Figura 22. Representación gráfica de los marcadores seleccionados en el índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) para las células musculares de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) bajo cultivo primario expuestas durante 13 días a condiciones control y a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato, (DEHP). Los puntos verdes resaltan aquellas variables que mostraron valores significativamente mayores de acuerdo con la prueba *Mann-Whitney-Wilcoxon* (secciones 7.4.2, 7.5.2 y 7.6.2). 75

Figura 23. Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, nanomoles por miligramo de proteína por minuto) y marcadores de daño oxidativo a lípidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS, nanomoles por miligramo de proteína) y a proteínas (carbonilos proteicos, CP, micromoles por miligramo de proteína) en cultivos primarios de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), mostradas en el gráfico, corresponden a la prueba de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. Los puntos grises en el gráfico representan datos atípicos. 76

Figura 24. Actividad de las enzimas antioxidantes en cultivos primarios de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y exposición a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP). SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S-transferasa; GR, glutatión-disulfuro reductasa; CAT, catalasa. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) corresponden a la prueba de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. Los resultados se muestran en unidades por miligramo de proteína. Los puntos grises en el gráfico representan datos atípicos. 78

Figura 25. Perfil transcripcional de genes que codifican para enzimas antioxidantes, marcadores de daño oxidativo, citocinas inflamatorias e indicadores de muerte programada en células de músculo esquelético de humanos (*Homo sapiens sapiens*, Hs) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*, Zc) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP). Los valores en el eje y se expresan como logaritmo en base 2 de la media de los valores normalizados de expresión. Las barras por encima y debajo del cero representan a los genes que fueron sobreexpresados y subexpresados, respectivamente, en los cultivos expuestos a DEHP.79

Figura 26. Representación gráfica de las puntuaciones discriminantes que incluyen los biomarcadores de actividad enzimática, producción de radical superóxido y niveles de daño oxidativo a proteínas y lípidos en muestras de cultivos primarios de células musculares de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM).....80

Lista de tablas

Tabla 1. Ejemplos de algunos antioxidantes y sus funciones (Hill et al. 2012; Sies 2020).	11
Tabla 2. Enzimas antioxidantes e isoformas en humano (Pontén et al. 2008).	11
Tabla 3. Biomarcadores de efectos biológicos, químicos y fisiológicos utilizados comúnmente para evaluar la salud de los ecosistemas acuáticos. Modificado de Hook et al. (2014).....	14
Tabla 4. Factores que modulan el metabolismo de agentes xenobióticos (modificado de Garattini 1983).	18
Tabla 5. Oligos diseñados para el análisis de la expresión génica en células de músculo esquelético de humano (H; <i>Homo sapiens sapiens</i>) y lobo marino de California (LMC; <i>Zalophus californianus</i>) en cultivo primario.	38
Tabla 6. Factores considerados en los modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) de la abundancia de células de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens sapiens</i>) y lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) en cultivo primario bajo condiciones control y en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) (1 mM) por 13 días.	44
Tabla 7. Viabilidad celular de los cultivos primarios de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens sapiens</i>) durante 13 días de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM).....	50
Tabla 8. Resumen de los efectos del tiempo de exposición en la capacidad proliferativa de cultivos primarios de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens sapiens</i>) bajo condiciones control y en respuesta a la exposición con di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) por 13 días.....	53
Tabla 9. Viabilidad celular de cultivos primarios de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) expuestos a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) durante 13 días de bioensayo.	56
Tabla 10. Resumen de los efectos del tiempo de exposición en la capacidad proliferativa de cultivos primarios de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) bajo condiciones control y exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) por 13 días.....	59
Tabla 11. Actividad de las enzimas antioxidantes de células de músculo esquelético de humano (<i>Homo sapiens sapiens</i>) bajo cultivo primario en condiciones control (n=25) y tras la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (n=25) por 13 días. La actividad catalítica de cada enzima se expresa en unidades por miligramo de proteína. En el análisis estadístico de los resultados no se incluyeron valores extremos.	63
Tabla 12. Actividad de las enzimas antioxidantes de células de músculo esquelético de lobo marino de California (<i>Zalophus californianus</i>) bajo cultivo primario en condiciones control (n=25) y tras la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (n=25) por 13 días. La actividad catalítica de cada enzima se expresa en unidades por miligramo de proteína. En el análisis estadístico de los resultados no se incluyeron valores extremos.....	65
Tabla 13. Valores de p-ajustados estimados a partir de la tasa de descubrimiento falso (FDR) para los valores p de la prueba Kruskal-Wallis (KW) realizada sobre las variables de expresión génica de enzimas antioxidantes, marcadores de reparación del daño oxidativo, citocinas inflamatorias e indicadores de muerte programada en células de músculo esquelético de humanos (<i>Homo sapiens sapiens</i>) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP).	69
Tabla 14. Valores de p-ajustados estimados a partir de la tasa de descubrimiento falso (FDR) para los valores p de la prueba Kruskal-Wallis (KW) realizada sobre las variables de expresión	

génica de enzimas antioxidantes, marcadores de daño oxidativo, citocinas inflamatorias e indicadores de muerte programada en células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP).72

Tabla 15. Resumen de las variables significativas ($p < 0.05$) dentro de las funciones discriminantes obtenidas del análisis discriminante lineal (ADL) para las variables de actividad enzimática, producción de radical superóxido y niveles de daño oxidativo a lípidos y proteínas en células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) y bajo condiciones control (sin DEHP).81

Abreviaturas

CASP	Caspasa
CAT	Catalasa
DEHP	Di (2-etilhexil) ftalato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
ER	Especies reactivas
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
MEHP	Mono-etilhexil ftalato
NOM	Norma Oficial Mexicana
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
PBS	Buffer fosfato salino
PPARA	Receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas
PRDX	Peroxirredoxina
RL	Radicales libres
SOD	Superóxido dismutasa
V _T	Volumen total

Glosario

Antioxidante	Compuestos químicos encargados de eliminar radicales libres, previniendo o retardando la oxidación de otros compuestos.
Bioacumulación	Acumulación neta, con el paso del tiempo, de sustancias persistentes en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).
Biomagnificación	Acumulación de productos químicos a lo largo de la red trófica, exhibiendo concentraciones sucesivamente mayores al ascender el nivel trófico.
Biomarcador	Medida indirecta o indicador de un estado biológico
Isquemia	Disminución del suministro de sangre a una parte del cuerpo. La isquemia puede causar daño a los tejidos debido a la falta de oxígeno y nutrientes.
Radical libre	Átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados en su último orbital, por lo que es inestable o reactivo y puede oxidar otras especies químicas
Reperfusión	Restauración del suministro sanguíneo a un tejido o área del cuerpo que se encuentra isquémica.
Segundo mensajero	Moléculas que se generan en el momento en que se activa un receptor, son de corta vida, y actúan específicamente sobre las moléculas efectoras.

1. INTRODUCCIÓN

El plastificante di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) es un compuesto orgánico tóxico, teratógeno e irritante utilizado como aditivo en la fabricación de productos plásticos para hacerlos más flexibles y duraderos (National Research Council 2008). Sin embargo, este compuesto no se une químicamente al polímero que conforma al producto plástico, por lo que puede liberarse, adherirse a partículas de polvo o desechos y ser fácilmente transportado a diferentes ambientes. Se trata de un compuesto de naturaleza lipofílica con la capacidad de atravesar la bicapa lipídica de las membranas biológicas (Josephy 2006; Kocbach-Bølling et al. 2013), ser absorbido, bioacumulado en tejidos y biomagnificado a través de las redes tróficas (Albro et al. 1982; Barsan 2007).

El transporte y difusión del DEHP, y su metabolito activo mono-etilhexil ftalato (MEHP), en el interior de las células induce cambios en la permeabilidad de la membrana provocando un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Rosado-Berrios et al. 2011; Park et al. 2020). Estas especies químicas, que incluyen a los radicales libres (moléculas que se caracterizan por tener con un electrón no apareado), son altamente reactivas, contribuyen a la oxidación de macromoléculas (ej. proteínas, lípidos y ADN) (Miranda 2008) y algunos fungen como segundos mensajeros en procesos de señalización celular (Gomez-Quiroz et al. 2017; Calderon et al. 2020). La presencia de las ERO al interior de la célula, tales como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), activa al factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) encargado de regular la expresión de enzimas antioxidantes (Hill et al. 2012; Halliwell y Gutteridge 2015). Las defensas antioxidantes se encargan de neutralizar a las especies reactivas (ER), previniendo o retardando la oxidación de sustratos oxidables (Halliwell y Gutteridge 2015). Si bien las ERO se producen de manera natural como parte del metabolismo aeróbico de las células, un incremento en su concentración en respuesta a fuentes exógenas puede inducir un estado de estrés oxidativo (Schrader y Fahimi 2004). El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción de especies reactivas (incluidas las ERO) en células o tejidos y las defensas antioxidantes generando daño oxidativo a macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Sies 1991; Pizzino et al. 2017). En este proceso, se alteran tanto la estructura como la

función de moléculas, células y tejidos (Sies 1991). Algunos de los efectos del daño oxidativo son la producción del aducto 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), a través del cual se puede determinar, de forma indirecta, el daño oxidativo al ADN (Beckman y Ames 1999); la producción de malondialdehído (MDA) derivado de la peroxidación de lípidos (Patton y Kurtz 1951); o bien la producción de carbonilos proteicos, indicadores de la oxidación de proteínas (Oliver et al. 1987).

Los niveles de algunas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y glutatión-disulfuro reductasa (GR), difieren entre especies adaptadas a distintos ambientes como lo son los humanos y los mamíferos marinos (Wilhelm-Filho et al. 2002). En condiciones de cultivo celular, estas diferencias se mantienen y responden a estresores como xenobióticos. Del Águila-Vargas et al. (2020) reportaron que la actividad de la GST en cultivo primario de músculo esquelético de elefante marino (*Mirounga angustirostris*) es 50% menor que la de humano cuando el tejido es expuesto a bajas concentraciones de cadmio. Estos resultados sugieren que el elefante marino cuenta con mayores defensas antioxidantes que las observadas en humanos. Ello se encuentra, en parte, asociado a que los mamíferos marinos se exponen frecuentemente a ciclos de isquemia/reperfusión (hipoxia/reoxigenación) durante cada buceo (Elsner y Gooden 1983; Vázquez-Medina et al. 2012). Los ciclos de hipoxia/reoxigenación promueven la producción de ERO y favorecen el incremento de las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) en tejidos de mamíferos marinos en comparación con los terrestres (Wilhelm-Filho et al. 2002; Vázquez-Medina et al. 2006). Es posible que las defensas antioxidantes en mamíferos marinos contribuyan a disminuir el riesgo de estrés oxidativo asociado no sólo a condiciones de hipoxia/reoxigenación, sino a otras condiciones que aumentan la producción de especies reactivas, como los contaminantes (Kanerva et al. 2012). Por lo anterior, podría esperarse que en tejidos de mamíferos marinos, incluyendo a los pinnípedos, los niveles de los indicadores de estrés oxidativo inducidos por exposición a DEHP sean menores en comparación con el humano. La respuesta de cada especie a la exposición a ftalatos depende de la dosis absorbida, tiempo de exposición (Tetz et al., 2013), metabolismo (Scott et al., 1987), tipo de tejido (Zuo et al., 2014), condiciones *in vitro* e *in vivo* (Zhou et al., 2013; Shen et al., 2015) y del ambiente en el que

habita (Gurdemir et al., 2019). En el caso del músculo esquelético de ratón, la exposición a DEHP y MEHP provoca alteraciones morfológicas en las mitocondrias, pasando de una red compleja a vesículas individuales (Chen et al. 2020). La fisión mitocondrial disminuye la producción de adenosín trifosfato (ATP) y aumenta la producción de ERO al interior de la célula (Jezek et al. 2018). El DEHP también bloquea la captación celular de glucosa estimulada por la insulina (Viswanathan et al. 2017). Con un menor suplemento de energía, las células satélite, encargadas de la regeneración del músculo, no pueden diferenciarse, comprometiendo la viabilidad celular (Viswanathan et al. 2017; Chen et al. 2020). El músculo esquelético representa el 30 y 38% de la masa de una mujer y un hombre adultos, respectivamente (Janssen et al. 2000; Hill y Olson 2012) y funge como reservorio de algunos xenobióticos, incluyendo al DEHP (Kluwe 1982; Standaert 1988). En el músculo esquelético ocurren la mayor parte de los procesos catabólicos y glucólisis, siendo un sistema con alta demanda energética y alta densidad mitocondrial (Kanatous et al. 1999; Ravussin y Smith 2006). Debido a que la mitocondria es la principal fuente de ERO intracelular (Park et al. 2011), una alta densidad de este organelo podría traducirse en una mayor vulnerabilidad del tejido ante condiciones de estrés oxidativo. A pesar de que el músculo esquelético compone gran parte de la masa corporal en mamíferos, se desconoce aún su papel en el metabolismo y respuesta a xenobióticos, específicamente ftalatos (ATSDR, 2019). Tanto el crecimiento como la supervivencia de las células pueden verse comprometidos si la producción de ERO aumenta con la exposición a y la acumulación de DEHP/MEHP (Yavasoglu et al. 2014). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial uso de los indicadores de estrés oxidativo como biomarcadores de la respuesta a la exposición a DEHP en cultivo primario de células derivadas de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) y humano (*Homo sapiens sapiens*).

2. ANTECEDENTES

2.1 Ftalatos o ésteres de ácido ftálico

Los ftalatos o ésteres de ácido ftálico son una familia de sustancias químicas compuestas de ácido ftálico con diferentes alcoholes. La forma en que los ftalatos se descomponen depende de la longitud de su cadena lateral de dialquilo, alquilo o arilo. Los ftalatos complejos tienen en sus estructuras más ramificaciones y formas isoméricas, por lo que, a mayor complejidad mayor es su peso molecular (masa molar), su afinidad por los lípidos y su resistencia a ser disociado (Huang et al. 2021). Al ser más lipofílicos (poco solubles en agua), los xenobióticos son absorbidos con mayor facilidad ya que logran pasar las membranas biológicas (Lundgren y DePierre 1990). De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) y la Unión Europea, se consideran seis ftalatos (Fig. 1) como contaminantes prioritarios debido a sus efectos sobre la salud humana (Das et al. 2021). Entre ellos se destaca el DEHP debido a su mayor uso dentro de la industria, pudiendo representar hasta el 60% del peso total de un producto plástico, incluyendo los juguetes para niños (Bustamante-Montes et al. 2004).

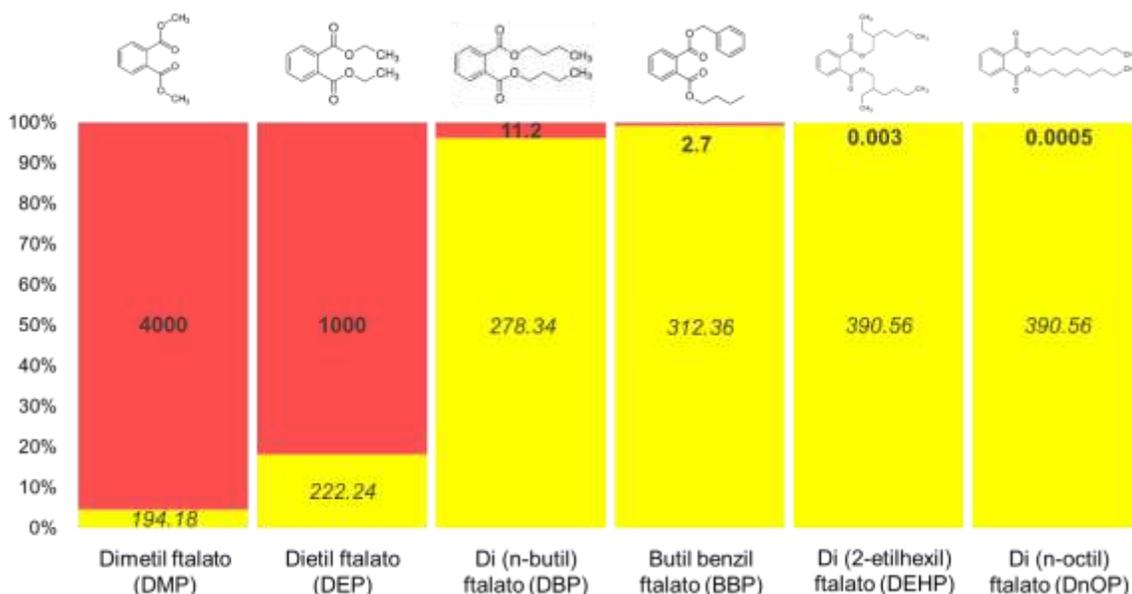


Figura 1. Ftalatos considerados contaminantes prioritarios por su papel como disruptores endócrinos. En fuente *itálica y negritas* se muestran los valores correspondientes al peso molecular (g mol^{-1}) y solubilidad en agua (mg L^{-1}) de cada ftalato, respectivamente.

Debido a sus características, podría esperarse que los ftalatos de mayor masa molecular, como el DEHP, sean más tóxicos ya que se difunden a través de las membranas y requieren de reacciones de conjugación para poder ser excretados del organismo. En general, se ha identificado la presencia de ftalatos en muestras de sangre, orina, heces, meconio, saliva, leche materna, fluido folicular, semen y líquido amniótico (Frederiksen et al. 2007).

La exposición a ftalatos puede ser a través del consumo de alimentos, productos con envoltorios plásticos, uso de cosméticos, juguetes para niños (Bustamante-Montes et al. 2004; Kim et al. 2014; Gurdemir et al. 2019; García-Fabila et al. 2020), productos de higiene personal, utensilios de cocina (Martina et al. 2012), parenteral (Fromme 2011), o bien, por interacciones con el ambiente (Pan et al. 2011). La exposición a ftalatos puede ser estimada de forma directa o cuantitativa a través de un análisis por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), o de forma indirecta a través de la expresión génica de enzimas antioxidantes (Herrero et al. 2014; Fernandes et al. 2018) y la cuantificación de productos de daño oxidativo (Kim et al. 2014). Las principales vías de absorción de ftalatos en humanos son la ingesta, contacto dérmico, por inhalación y vía parenteral (National Research Council 2008) (Fig. 2).

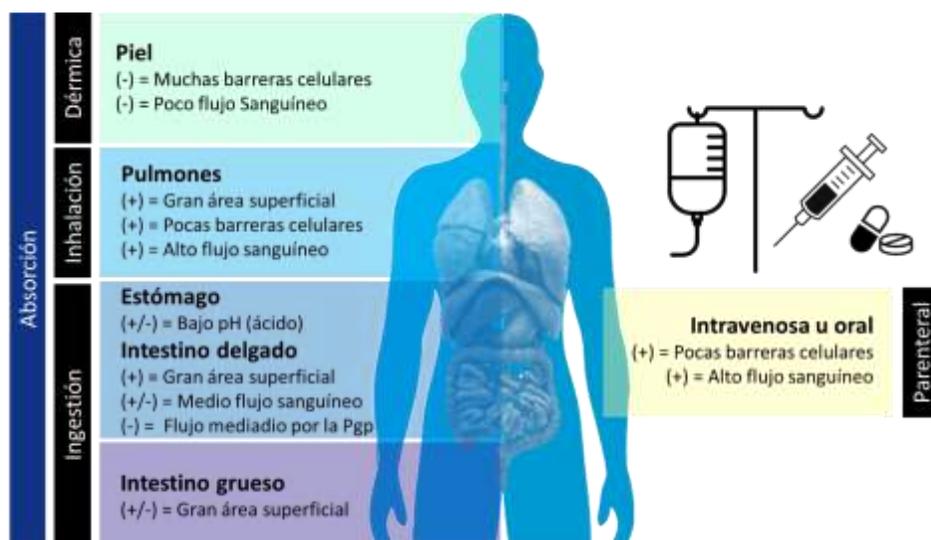


Figura 2. Vías y factores determinantes de la absorción de xenobióticos en el humano. (+) Favorece la absorción; (-) reduce la absorción; (+/-) efecto indistinto; (Pgp) glucoproteína-P 1, proteína transportadora encargada de bombear agentes xenobióticos fuera de la célula. Modificado de Franklin (2015).

2.1.1 Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y sus efectos en mamíferos

El DEHP ($C_{24}H_{38}O_4$) es un xenobiótico orgánico de naturaleza lipofílica (liposoluble) con muy baja solubilidad en agua (0.00003%, 23.8 °C) (Barsan 2007). Fue introducido como plastificante por primera vez en 1933 (Selwitz 1988), reconociéndose como un compuesto tóxico y teratógeno en los años 1980's (Wypych 2017). Su concentración en la naturaleza varía de acuerdo con el medio en que se deposite (Net et al. 2015). Net et al. (2015) reportaron que la concentración de DEHP en el polvo es de $600 \mu\text{g g}^{-1}$ (E.U.), estimando una absorción mayor a 70 mg kg^{-1} al día por persona. La Organización Mundial de la Salud (World Health Organization 2017) declaró que la concentración permisible de DEHP en el agua potable es de 0.008 mg L^{-1} , considerando que una persona promedio (60 kg) puede tolerar un consumo de $25 \mu\text{g}$ de DEHP por kilogramo de peso al día. En México, se estima que la población escolar infantil (6-12 años) absorbe $19.50 \mu\text{g}$ de DEHP por kilogramo de peso al día, siendo este compuesto el plastificante más utilizado en el país (García-Fabila et al. 2020). En el Golfo de California se ha reportado que la concentración de MEHP en agua marina es de 13.75 ng g^{-1} base húmeda (B.H.), mientras que su concentración en grasa de ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) es de 54.8 ng g^{-1} B.H. (Fossi et al. 2016; Fossi 2019).

El metabolismo del DEHP ocurre principalmente en el intestino y parénquima, donde es hidrolizado por lipasas y esterases a su metabolito primario MEHP. Al ser un producto altamente reactivo, el MEHP es conjugado por reacciones de glucuronidación en metabolitos secundarios incluyendo diácidos y cetoácidos. Estos metabolitos tienen la característica de ser más hidrofílicos, por lo que son excretados más fácilmente a través de la orina, heces, sudor o saliva (Frederiksen et al. 2007). En humanos, el 70% del DEHP absorbido y sus metabolitos es excretado, mientras que el remanente se difunde hacia los capilares donde es transportado de manera activa por el flujo sanguíneo (Kluwe 1982; Koch et al. 2006; Koch y Calafat 2009). El DEHP es soluble en sangre y fluidos ricos en lipoproteínas (HSDB 2008), por lo que en los capilares se adhiere fácilmente a la membrana de los eritrocitos y parte de este compuesto se difunde hacia el interior de la célula roja (Rael et al. 2009). En humanos, el tiempo de retención

del DEHP en sangre es de 14.54 minutos (Haishima et al. 2014). Durante este período, el DEHP es transportado y distribuido hacia diferentes órganos y tejidos en el cuerpo.

Al llegar al hígado, el DEHP pasa nuevamente por el proceso de biotransformación (Fig. 3), en el cual se cumplen dos propósitos (1) aumentar su solubilidad en agua y (2) reducir su actividad biológica para que pueda ser fácilmente transportado y desechado (National Research Council 2008). Dentro de las células hepáticas no todo el DEHP es biotransformado; una parte del compuesto es bioacumulado (Albro et al. 1982), mientras que el resto regresa al sistema circulatorio. En mamíferos, los tejidos que funcionan como reservorios de DEHP son el intestino, estómago, hígado, riñón, tejido adiposo, testículos, ovarios y músculo esquelético; mientras que los principales reservorios de MEHP son el intestino, corazón, hígado, riñón, pulmón y músculo esquelético (Kluwe 1982). Cuando el DEHP no es hidrolizado al interior de las células, se une a receptores nucleares como el receptor constitutivo de androstano (CAR), el receptor aril-hidrocarburo (AhR) y el receptor X de pregnano (PXR), los cuales facilitan su transporte hacia el interior del núcleo. Dentro del núcleo, el DEHP puede provocar daños en el ADN, en las señales de transducción y, por consiguiente, en la funcionalidad de la célula (Fang et al. 2016; Baldwin 2019).

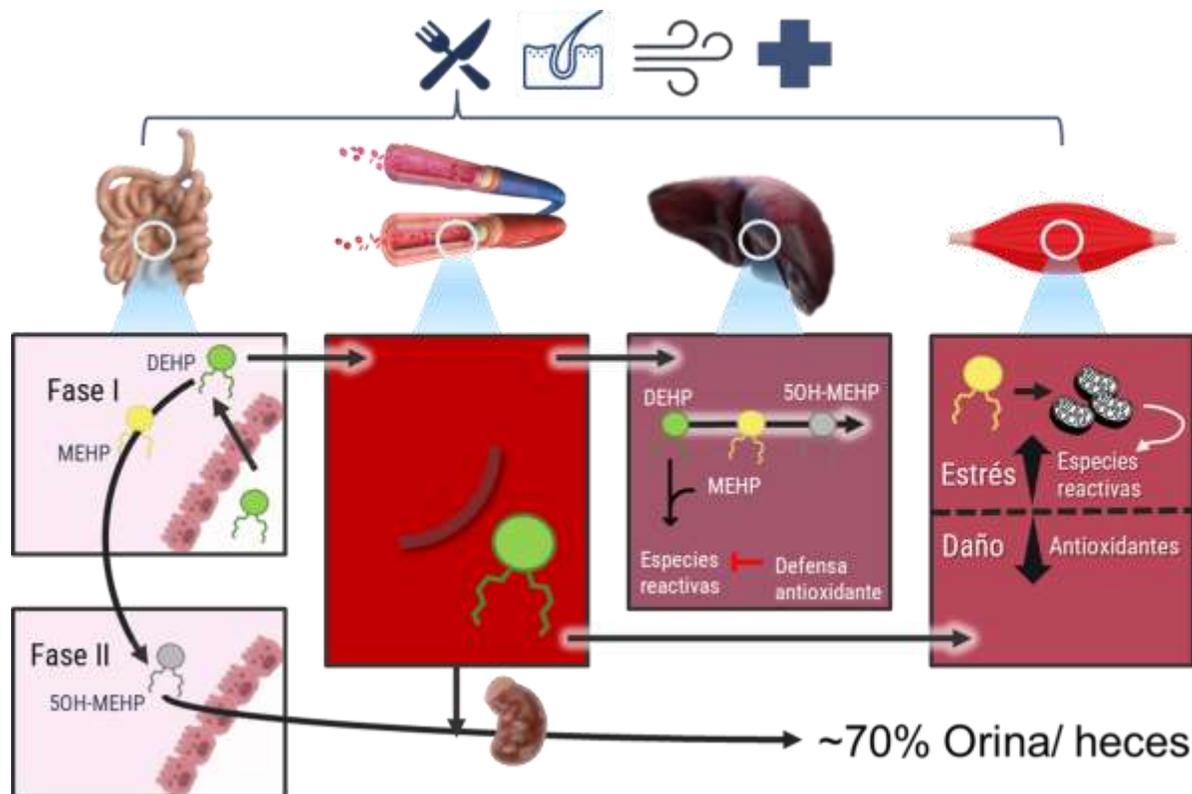


Figura 3. Biotransformación del di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en mamíferos (Peck y Albro, 1982). Las reacciones metabólicas que se desarrollan durante la biotransformación se subdividen en la fase I, que incluye reacciones de funcionalización (p. ej., reacciones de óxido-reducción e hidrólisis), y la fase II, donde ocurren reacciones de conjugación (p. ej., glucuronidación y esterificación). El proceso biológico inicia con la transformación del DEHP a sus metabolitos y finaliza con la excreción de la mayor proporción de éstos. Altas concentraciones de ftalatos pueden comprometer la homeostasis del tejido provocando daño y estrés oxidativo en las células.

La exposición crónica a concentraciones relevantes de DEHP y sus metabolitos puede comprometer la salud animal (National Research Council 2008). Algunos de los efectos reportados en humanos incluyen afectaciones a los sistemas circulatorio, inmune, endócrino, nervioso y reproductivo (Singh y Li 2011). Otros efectos son cambios en la química del cerebro, autismo, dificultad respiratoria, asma, irritación de las mucosas, inflamación del tejido mamario, aumento en la resistencia a insulina, reducción de la fertilidad y cáncer (National Research Council 2008).

Hay pocos antecedentes del estudio de DEHP en el ambiente marino en México (Fossi et al. 2016; Vilorio-Gómora et al. 2018; Zenteno-Savín et al. 2018), y se conoce muy poco acerca de sus efectos sobre especies silvestres, ya que la mayor parte de la información se concentra en especies modelo (Anexo A) o de interés comercial (Norman et al. 2007; Ji et al. 2010; Kalo et al. 2015). En general, los ftalatos modifican la homeostasis redox de distintos tejidos, tanto en especies terrestres como marinas (Gobas et al. 2003; Singh y Li 2011). En mamíferos, la exposición crónica a DEHP aumenta la formación de ERO intracelular, induciendo un estado de estrés oxidativo (Rosado-Berrios et al. 2011; Park et al. 2020). La sobreproducción de ERO activa al factor nuclear eritroide 2 (NRF2), encargado de regular la producción de agentes citoprotectores como los peroxisomas (Elcombe y Mitchell 1986; Lapinskas et al. 2005), proteínas y enzimas antioxidantes (Zhang, Qin, et al. 2019).

2.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre oxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros, que puede causar una disrupción en la señalización y control redox en unidades biológicas (Sies 2015). Los oxidantes o especies reactivas son radicales libres y otras moléculas no radicales promotoras de estrés oxidativo, las cuales participan en procesos de oxidación de moléculas como lípidos, proteínas y ADN (Sies 1991; Sies et al. 2017), así como en procesos de señalización celular (Gomez-Quiroz et al. 2017; Calderon et al. 2020). Las especies reactivas derivan del metabolismo celular, siendo las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) las más comunes dentro de los sistemas biológicos (Halliwell y Gutteridge 2015). Harman (1956) nombra a las especies radicales y no radicales promotoras de estrés oxidativo derivadas del oxígeno como ERO. Algunos ejemplos de ERO son el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), hidroperoxilo (HO_2^{\bullet}), peroxilo (RO_2^{\bullet}), alcoxi (RO^{\bullet}), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozono (O_3), oxígeno singulete (1O_2), entre otros (Sies et al. 2017). La detección de especies reactivas en sistemas biológicos es difícil ya que estas moléculas existen en concentraciones muy bajas y reaccionan rápidamente cerca de su sitio de formación (con antioxidantes, con otras moléculas y/o con componentes celulares), por lo que tienen corto tiempo de vida media y poca capacidad para acumularse (Camus et al., 1994). En mamíferos

terrestres, se ha observado que el aumento de ERO y de los productos de daño oxidativo por exposición a ftalatos puede agravar condiciones de salud tales como la dermatitis atópica (Wu et al. 2015), asma (Franken et al. 2017), hepatitis (Sinha et al. 2015), diabetes (Dong et al. 2018), infertilidad (Guo et al. 2014), sarcopenia (Yang et al. 2022), entre otras. La exposición a ftalatos puede incluso ocasionar malformaciones en el desarrollo embrionario de humanos y otros mamíferos (Nelli y Pamanji 2017).

En mamíferos marinos, se ha reportado que las poblaciones de foca hispida (*Pusa hispida*) con mayor exposición a contaminantes orgánicos persistentes, como el policlorobifenilo (PCB), presentan mayor actividad de las enzimas antioxidantes GST (Routti et al. 2008) y GPx (Kanerva et al. 2012), en comparación con las poblaciones en hábitats menos contaminados. En estudios sobre exposición a otro tipo de contaminantes, se reporta que las células musculares en cultivo del elefante marino del norte (*M. angustirostris*) presentan una menor concentración de carbonilos proteicos (productos de la oxidación de proteínas) en comparación con células musculares en cultivo de humano cuando las células de ambas especies son expuestas a 5 μM de cadmio (CdCl_2) por 6 horas (Del Águila-Vargas et al. 2020).

En sistemas biológicos, el término antioxidante se refiere a cualquier sustancia que, hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de su sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge 2015). Se entiende por sustrato oxidable cualquier molécula orgánica o inorgánica que es susceptible de oxidación, participando en reacciones redox; algunos de los sustratos oxidables que se pueden encontrar *in vivo* son proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Halliwell y Gutteridge 2015). Algunos ejemplos de antioxidantes son las enzimas SOD, GPx, GST, GR y CAT, así como el tripéptido glutatión reducido (GSH), la vitamina C, entre otros (Sies 2020). Cada uno de estos antioxidantes, dependiendo del tipo de molécula, cumple con funciones específicas dentro de las células (Tabla 1) (Hill et al. 2012; Sies 2020).

Tabla 1. Ejemplos de algunos antioxidantes y sus funciones (Hill et al. 2012; Sies 2020).

Antioxidante	Reacción
SOD	$2O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + H_2O_2$
GPx	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$
GST	$RX + GSH \rightarrow RSG + HX$
GR	$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
CAT	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
PRDX	$PRDX-S^- + H_2O_2 \rightarrow PRDX-SO^- + H_2O$
GSH	Participa como sustrato de GPx, GST y GR

Algunas enzimas antioxidantes forman parte de familias multigénicas presentes en todos los mamíferos, de tal manera que la diversidad estructural de sus isoformas les proporciona la capacidad de conjugarse o degradar una amplia gama de compuestos. Ello ocurre, por ejemplo, en el caso de la enzima GST de cordados, la cual cuenta con una variedad de isoformas encargadas de la conjugación de GSH a agentes xenobióticos facilitando la eliminación de estos compuestos por las células (Kim, Dahms, et al. 2010) (Tabla 2).

Tabla 2. Enzimas antioxidantes e isoformas en humano (Pontén et al. 2008).

Enzima	Isoforma	Localización celular	Especificidad a un tejido (ARN)
Superóxido dismutasa (SOD)	SOD1	Citosol, peroxisomas y núcleo	Hígado
	SOD2	Mitocondria	Músculo esquelético
	SOD3	Citosol y matriz extracelular	Cerebro
Glutación peroxidasa (GPx)	GPx1	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y peroxisomas	Cerebro e hígado
	GPx2	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y peroxisomas	Hígado
	GPx3	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y peroxisomas	Riñón
	GPx4	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y núcleo	Testículos
	GPx5*	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y peroxisomas	Epidídimo
	GPx6*	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y peroxisomas	Epidídimo
	GPx7	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y peroxisomas	Placenta

	GPx8	Citosol, retículo endoplásmico, matriz extracelular, mitocondria y peroxisomas	Placenta
Glutación S-transferasa (GST)	GST alpha	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Hígado
	GST mu	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Hígado
	GST theta	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Seno
	GST pi	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Esófago
	GST zeta	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Hígado
	GST sigma **	Citosol y retículo endoplásmico	Músculo cardiaco
	GST kappa	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Hígado
	GST omega	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Hígado
	GST microsomal	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y peroxisomas	Hígado
	Glutación reductasa (GR)	GR	Citosol y mitocondria
Catalasa (CAT)	CAT	Peroxisomas, mitocondria y citoplasma	Hígado
Peroxirredoxina (PRDX)	PRDX1	Citosol, matriz extracelular y mitocondria	Esófago
	PRDX2	Citosol, matriz extracelular y mitocondria	Lengua
	PRDX3	Citosol, matriz extracelular y mitocondria	Hígado
	PRDX4	Citosol	Páncreas
	PRDX5	Citosol, matriz extracelular y mitocondria	Músculo esquelético
	PRDX6	Citosol, retículo endoplásmico, mitocondria, matriz extracelular y lisosomas	Músculo esquelético

* Ausente en músculo esquelético; ** prostaglandina D sintasa (PTGDS) como única representante de la familia glutación S-transferasa en vertebrados.

Algunos antioxidantes, especies reactivas y productos del daño oxidativo son utilizados como biomarcadores o marcadores biológicos de la exposición a ftalatos (Yavasoglu et al. 2014; Cho et al. 2015; Franken et al. 2017; Gurdemir et al. 2019). El término marcador biológico surge en los años 1950s para referirse a las alteraciones estructurales o funcionales que se observan en

respuesta a un agente estresor específico y pueden utilizarse como indicadores de la exposición a una condición adversa; por ejemplo, cambios en la morfología de los heterófilos en suero sanguíneo como indicadores de exposición a rayos X (Porter 1957).

Shugart et al. (1992) utilizaron el término biomarcador para describir aquellas mediciones *in situ* o *in vitro* que indican tanto que un organismo o una población estuvo expuesta a un contaminante tóxico como la magnitud de la respuesta fisiológica del organismo frente al xenobiótico. También puede definirse como biomarcador el conjunto de características que son objetivamente medidas y evaluadas como indicadores de procesos biológicos (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Por ejemplo, los cambios en la diversidad y composición de la microbiota del mono aullador negro (*Alouatta pigra*) indican el grado de degradación de su hábitat (Amato et al. 2013). Para Amiard-Triquet y Amiard (2012) el objetivo de un biomarcador es proveer información temprana, relevante y específica acerca del impacto de un contaminante o sustancia química en un ser vivo o en un ecosistema. Un biomarcador, como valor sustituto o medida indirecta (p. ej., restos plásticos en heces), puede brindar información acerca de una variable (p. ej., exposición a contaminantes en el medio) cuya medición directa podría ser invasiva o menos práctica (Aronson, 2005; Strimbu y Tavel, 2010; Blazer et al., 2012). Actualmente, existen diversos biomarcadores identificados como indicadores de la presencia de contaminantes en los ecosistemas acuáticos (Tabla 3).

En biología, existen diferentes biomarcadores acordes a la disciplina de estudio. Un biomarcador, dentro del contexto biomédico, podría referir a la actividad de una enzima como indicador de un estado biológico o una condición (Siderowf et al. 2018). Por otra parte, un biomarcador genómico utiliza la cuantificación de ácidos nucleicos (ADN/ARN) o la expresión, función y/o regulación de un gen como indicador de procesos biológicos, enfermedades y respuestas a la exposición a factores específicos (Food and Drug Administration, HHS 2008).

Tabla 3. Biomarcadores de efectos biológicos, químicos y fisiológicos utilizados comúnmente para evaluar la salud de los ecosistemas acuáticos. Modificado de Hook et al. (2014).

Categoría	Medida e indicación	Referencia
Marcadores de estrés oxidativo	Enzimas antioxidantes, cofactores y productos del metabolismo que son cuantitativamente alteradas cuando se exponen a un contaminante u otro reto no químico	Ahmad et al. (2006); Girón-Pérez et al. (2013); Pereira et al. (2013); Williams y Gallagher (2013)
Marcadores de la estabilidad de la membrana lisosómica	Organelos subcelulares que contienen enzimas hidrolíticas sensibles a agentes tóxicos, resultando en la ruptura de la membrana y fuga de metales	Ringwood et al. (2004); Edge et al. (2012)
Índices de condición	El decremento en el peso de un órgano relativo al peso total del organismo puede ser indicativo de intoxicación o enfermedad	Johnson et al. (2008); Blazer et al. (2012)
Daño al ADN	Algunas alteraciones en la estructura del ADN (inserciones o deleciones) son reflejo de la exposición a xenobióticos y sus efectos	Balk et al. (2011)
Transcriptoma	La secuenciación masiva del transcriptoma de un tejido ayuda a identificar las rutas celulares que son alteradas por la exposición a estresores químicos y ambientales	Connon et al. (2012); Uren-Webster et al. (2013)

ADN, ácido desoxirribonucleico.

2.3 Músculo esquelético

El músculo esquelético se compone de células multinucleadas, las cuales forman largas fibras involucradas en los movimientos voluntarios y representan entre el 30 y 40% de la masa corporal de un humano adulto (Janssen et al. 2000; Hill y Olson 2012). En los intersticios de las miofibrillas se encuentran diferentes tipos celulares incluyendo células satélite, fibroblastos, células mesenquimáticas, adipocitos y células intersticiales (Dueweke et al. 2017; Giordani et al. 2019; Alarcin et al. 2021). Las células precursoras miogénicas o células satélite, son unidades mononucleadas, de forma esférica, encargadas de la regeneración muscular (Brun et al. 2017). Se trata de células multipotenciales situadas entre el sarcolema y la lámina basal del músculo. Las células satélite tienen la característica de permanecer inactivas hasta que un estímulo, como el daño muscular, activa al factor de transcripción Pax7 promoviendo la división mitótica y

diferenciación celular formando mioblastos. Los mioblastos proliferan y se fusionan formando miotubos que finalmente dan lugar a células multinucleadas conocidas como miocitos. Los miocitos posteriormente maduran en fibras musculares (Rosero et al. 2015). La abundancia de células satélite tiende a reducirse con el tiempo promoviendo la degeneración del músculo con la edad (Motohashi y Asakura 2014). Por lo que la abundancia de este tipo celular es un indicador de la capacidad de replicación y regeneración del músculo esquelético.

En el músculo esquelético ocurren la mayoría de los procesos catabólicos y glucolíticos; este tejido cuenta con una alta densidad mitocondrial y requiere de mayor energía en comparación con otras células (Kanatous et al. 1999; Ravussin y Smith 2006). Las mitocondrias son la principal fuente de ERO al interior de las células (Park et al. 2011). Por lo anterior, podríamos esperar que, a mayor densidad mitocondrial, mayor susceptibilidad del tejido a condiciones de daño y estrés oxidativo inducidos por factores exógenos, como los contaminantes.

2.3.1 Características del músculo esquelético de humano y lobo marino de California

El músculo esquelético se compone de tres tipos de fibras, las fibras de contracción lenta (tipo I), y las fibras de contracción intermedia (tipo IIA) y rápida (tipo IIB) (Hill et al. 2012). En el humano, predominan las fibras tipo I (~50%) en comparación con las tipo IIA (~25%) y IIB (~25%) (Häggmark y Thorstensson 1979). En el lobo marino de California, la distribución de las miofibrillas es más heterogénea que en el humano, predominando las fibras tipo I (~44%) sobre las tipo IIA (~39%) y tipo IIB (~17%) (Ponganis y Pierce 1978). Existen diferencias en la abundancia de células satélite y la actividad de ciertas enzimas entre los grupos musculares y los tipos de fibras musculares. Las fibras tipo I cuentan con mayor número de células satélite en comparación con las fibras tipo II (Holterman y Rudnicki 2005). Las células de contracción lenta se utilizan con mayor frecuencia, requieren energía del metabolismo aeróbico y se encuentran mayormente irrigadas (Hawke y Garry 2001). Moore et al. (2014) observaron que existen cambios ontogénicos en el tipo de fibra de los músculos natatorios de *M. angustirostris*, tal que las fibras musculares tipo II están presentes en individuos juveniles pero no en adultos. Powers et al. (2011) observaron que la actividad de SOD en humanos, posterior a un esfuerzo físico, es

mayor en músculo esquelético con predominancia de fibras tipo I y tipo IIA en comparación con músculos con mayor proporción de fibras tipo IIB. En un experimento similar en roedores, Osório-Alves et al. (2020) encontraron que luego de 3 minutos de esfuerzo físico, la actividad de CAT no muestra diferencias significativas entre individuos aclimatados al ejercicio e individuos control.

La densidad mitocondrial en músculo esquelético de humano es del 3 al 8% (Larsen et al. 2012), mientras que la densidad mitocondrial del músculo esquelético de lobo marino de California es del 3 al 9.7% (Kanatous et al. 1999). La capacidad oxidativa y la capacidad antioxidante difieren entre especies. En estado basal, la actividad de GR en células musculares en cultivo de humano y elefante marino del norte es similar (Del Águila-Vargas et al. 2020), mientras que la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) en tejido muscular es mayor en humanos (Pansarasa et al. 2000) que en la foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) (Allen et al. 2019). Del Águila et al. (2020) reportan que en respuesta a la exposición a cadmio la actividad de las enzimas antioxidantes GST, GR, y GPx es mayor en células musculares de humano que en aquellas de elefante marino del norte (*M. angustirostris*). Es posible que las diferencias, tanto en la capacidad oxidante como en la capacidad antioxidante, entre humanos y mamíferos marinos se relacionen con las adaptaciones inherentes de cada especie, específicamente, los hábitos de buceo en apnea de delfines, focas, lobos marinos y ballenas (Häggmark y Thorstensson 1979; Elsner y Gooden 1983; Kanatous et al. 1999; Vázquez-Medina et al. 2012; Moore et al. 2014).

2.3.2 Toxicidad del di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en músculo esquelético

Chen et al. (2020) encontraron que las células de músculo esquelético de ratón expuestas a DEHP/MEHP presentan alteraciones en la función mitocondrial, inhibiendo los procesos de miogénesis. Si bien se trata de un tejido donde, de manera natural, se produce una gran cantidad de ERO debido a la actividad contráctil de las miofibrillas (Beckendorf y Linke 2015), la exposición a DEHP puede exacerbar la producción de ERO comprometiendo la regeneración del tejido muscular vía activación de caspasas (Fulle et al. 2004; Yang et al. 2022). Asimismo, Chen

et al. (2013) observaron que los mioblastos de ratón (C2C12) expuestos a DEHP muestran una reducción en la expresión de la miogenina, un factor de regulación del proceso de miogénesis, inhibiendo la diferenciación de las células satélite precursoras del tejido muscular. En humanos la exposición diaria a ftalatos puede conducir al desarrollo de patologías caracterizadas por la degeneración muscular como la sarcopenia (Yang et al. 2022) o resistencia a la insulina en músculo (Wei et al. 2020).

La presencia de DEHP y MEHP en tejidos de mamíferos marinos ha sido reportada en la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) (Fossi et al. 2012). En la Bahía de La Paz, las concentraciones de MEHP en grasa de ballena de aleta han sido asociadas al consumo de microplásticos directamente del medio o a través de la ingesta de presas contaminadas (ej. krill) (Fossi et al. 2016). A pesar de contar con evidencias sobre los riesgos de la exposición a ftalatos en mamíferos terrestres, la información acerca de su acumulación en tejidos de pinnípedos (fócidos y otáridos) es escasa (Vorkamp y Danmarks Miljøundersøgelser 2004), desconociéndose sus efectos. El estudio de los efectos del DEHP en cultivos primarios de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) no tiene precedentes en la literatura.

El efecto de los xenobióticos no sólo depende de las concentraciones del contaminante, también depende de la capacidad antioxidante del organismo, la cual es modulada por diversos factores (Tabla 4) (Garattini 1983).

Tabla 4. Factores que modulan el metabolismo de agentes xenobióticos (modificado de Garattini 1983).

Regulador	Condición
Control endógeno	Especie
	Raza
	Antioxidantes
	Sexo
	Edad
	Patología
Influencia del ambiente	Vía de administración
	Dosis
	Dieta
	Estacionalidad
	Presencia de otros xenóbióticos

2.4 Adaptación frente al estrés oxidativo: el buceo

Los pinnípedos son mamíferos adaptados al medio marino, dependen del mismo para sobrevivir y alimentarse (Hoelzel 2002). Una de estas adaptaciones es el buceo, en el cual los individuos se someten a períodos de apnea durante actividades como el forrajeo (Castellini 1991), sueño (Karamanlidis et al. 2017) y migración (Stewart y DeLong 1995). De acuerdo con su capacidad de buceo, los pinnípedos emplean distintas estrategias previas a la inmersión. Los fócidos exhalan todo el aire contenido en sus pulmones (McDonald y Ponganis 2012; Berta et al. 2015). Por el contrario, antes de un buceo, los otáridos inhalan en superficie promoviendo el intercambio gaseoso entre la membrana especializada en alvéolos y la pared capilar de los vasos sanguíneos; al exceso de oxígeno disponible se conoce como hiperoxia (McDonald y Ponganis 2012; Berta et al. 2015). Una vez iniciada la apnea y durante el buceo, se presenta la respuesta al buceo, que consiste en la disminución de la frecuencia cardíaca (bradicardia), vasoconstricción periférica, disminución del flujo sanguíneo (isquemia) a los órganos y tejidos (hipoperfusión) (excepto al sistema nervioso central), disminución de la tasa metabólica en los tejidos isquémicos, y uso de reservorios de oxígeno en sangre (hemoglobina) y músculo (mioglobina) (Berta et al. 2015). Al terminar el buceo y volver a respirar en la superficie, se restablecen el flujo sanguíneo y la oxigenación de los tejidos, procesos conocidos como reperfusión y reoxigenación (Weitzner

et al. 2020). Al conjunto de procesos de vasoconstricción y restablecimiento de la circulación se le conoce como ciclo de isquemia/reperfusión (Fig. 4).

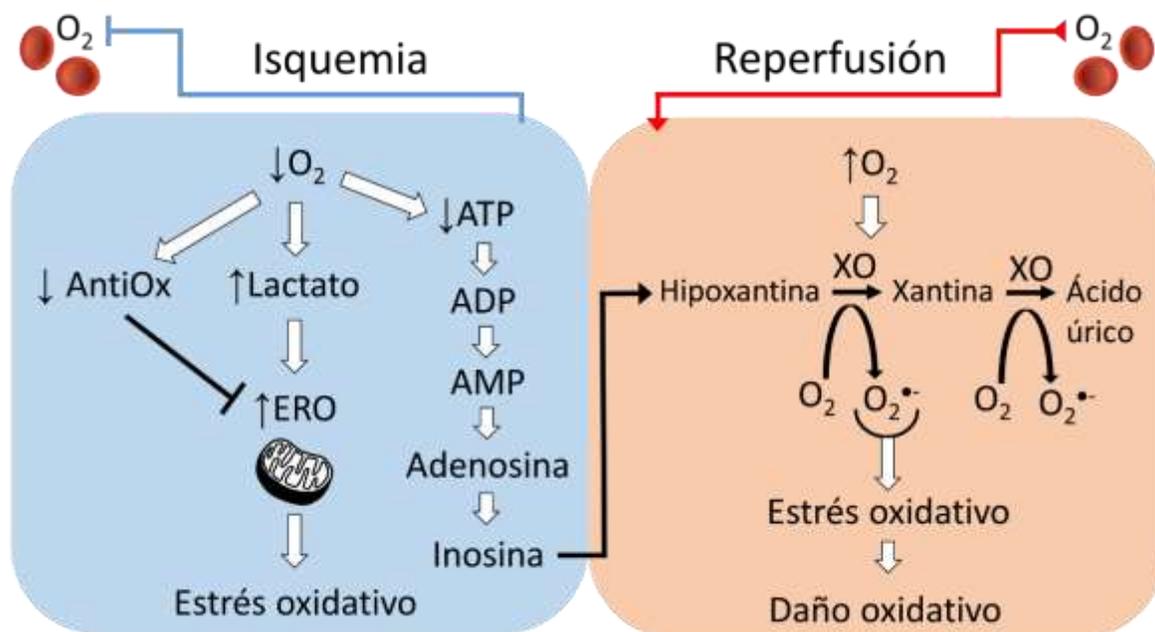


Figura 4. Representación gráfica de la producción de especies reactivas al oxígeno (ERO) durante el ciclo de isquemia/reperfusión en una célula. O_2 , Oxígeno; AntiOx, antioxidantes; XO, xantina oxidasa; ATP, adenosín trifosfato; ADP, adenosín difosfato; AMP, adenosín monofosfato; $O_2^{\bullet-}$, anión radical superóxido; T, bloquea.

A pesar de que en mamíferos terrestres (p. ej., humano) se ha observado que tras una inmersión corta (2 min de apnea a 40 m de profundidad) hay evidencias de productos de daño y estrés oxidativo (Mrakic-Sposta et al., 2019), los mamíferos marinos aparentemente no presentan daño oxidativo a consecuencia del buceo (Allen and Vázquez-Medina, 2019). La respuesta adaptativa antioxidante inducida por un estímulo oxidativo crónico, como el buceo en apnea, puede proveer ventajas frente a otros agentes oxidantes como los contaminantes (Routti et al. 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

En mamíferos, la exposición crónica a DEHP puede provocar problemas a la salud, incluyendo alteraciones del desarrollo embrionario y del sistema endócrino, así como afectaciones irreversibles a células y tejidos (National Research Council 2008; Alimba y Faggio 2019). En México, el estudio de ftalatos, como el DEHP y sus metabolitos, en ambientes marinos se ha limitado a la detección de su presencia en grasa de ballena de aleta y sus concentraciones en las costas (Fossi et al. 2016). Mientras que la información disponible acerca de los efectos del DEHP en mamíferos terrestres se encuentra sesgada a especies modelo (p. ej., humano y ratas Wistar) bajo condiciones controladas (García-Fabila et al. 2020; Brassea-Pérez et al. 2022). Asimismo, la información disponible sobre los efectos de la exposición a DEHP en organismos en vida libre, en otras regiones del mundo, es escasa y sólo incluye a la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) y marsopa de puerto (*Phocoena phocoena*) (Fossi et al. 2012; Rian et al. 2020).

A partir de los cultivos celulares primarios, es posible obtener información que refleje el estado fisiológico y bioquímico de un tipo celular específico. De acuerdo con los lineamientos de la Comisión Nacional en Investigación Científica, el Comité Hospitalario de Bioética (F-CNIC 2018-785-010; F-CNIC 2019-174 y R 2000-785-008) y el Comité de bioética (CONBIOÉTICA, 09-CEI-009-20160601), el establecimiento de réplicas experimentales a partir de cultivos celulares (cultivos secundarios), minimiza el empleo de intervenciones quirúrgicas para la obtención de la muestra biológica, por lo que se le considera un método no invasivo. Ya que los cultivos primarios mantienen algunas de las características genéticas del individuo, conforman un depósito de información para estudios adicionales (Wang et al. 2002). El estudio de la actividad y expresión de las enzimas antioxidantes en cultivo primario de músculo esquelético de humano y lobo marino de California (*Zalophus Californianus*) en presencia de concentraciones conocidas de DEHP contribuirá a la identificación y evaluación de las respuestas bioquímicas en mamíferos y permitirá su evaluación como potenciales biomarcadores de exposición a este plastificante. Los resultados del presente estudio permitirán establecer las bases de los efectos de la exposición a ftalatos asociados a plásticos en tejidos con alta actividad metabólica, como el músculo esquelético, en mamíferos.

Adicionalmente, se ofrecerán dentro del ámbito social productos de divulgación derivados de nuestros resultados que contribuirán a la incorporación y apropiación del conocimiento científico al público en general, en temas de los efectos negativos de los plásticos a la salud, la importancia de la reducción del uso de éstos, y buenas prácticas de consumo y manejo de residuos sólidos.

4. HIPÓTESIS

Los indicadores de estrés oxidativo, incluyendo la actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes (SOD, GPX, GST, GR y CAT), en células musculares en cultivo primario de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) pueden ser utilizados como biomarcadores de la exposición al plastificante DEHP.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la utilidad de la actividad y expresión génica de las enzimas antioxidantes, producción de radical superóxido, indicadores de daño oxidativo y de muerte celular como biomarcadores de la exposición a DEHP (1 mM) en cultivo primario de células musculares de humano (*Homo sapiens sapiens*) y de lobo marino de California (*Zalophus californianus*).

5.2 Objetivos particulares

- Establecer los límites de exposición a DEHP, en términos de tiempo y concentración, en los que la viabilidad de cultivos primarios de músculo esquelético de humano y lobo marino de California se reduce a 60%.
- Evaluar los efectos *in vitro* del DEHP en la morfología y proliferación de células de músculo esquelético de humano y lobo marino de California.
- Cuantificar la actividad y expresión de las enzimas antioxidantes en respuesta a la exposición a DEHP en los cultivos primarios de músculo esquelético de humano y de lobo marino de California.
- Evaluar el daño oxidativo en los cultivos primarios de músculo de humano y de lobo marino de California producido por la exposición a DEHP.
- Comparar la actividad y expresión génica de las enzimas antioxidantes y el daño oxidativo en cultivos primarios de músculo esquelético entre condiciones de cultivo (control y DEHP 1 mM) y entre especies.
- Evaluar la utilidad de los biomarcadores de daño y estrés oxidativo como indicadores de la exposición a DEHP (1 mM) en células musculares de mamíferos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Extracción y aislamiento de tejido muscular

Las muestras de músculo esquelético de humano ($n=5$) fueron obtenidas a través del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Anexo B). Se extrajeron alrededor de 3 g de músculo esquelético abdominal de mujeres en edad reproductiva (15-35 años), sanas (sin enfermedades crónicas), con seguimiento prenatal y cesárea programada. El consentimiento informado y protocolo de investigación fue aprobado por La Comisión Nacional en Investigación Científica y Comité Hospitalario de Bioética (F-CNIC 2018-785-010; F-CNIC 2019-174 y R 2020-785-008). Lo anterior fue desarrollado de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética en Investigación (CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601) y el Código de Ética de la Asociación Mundial de la Salud (declaración de Helsinki). Las muestras de músculo esquelético (longísimo y pectoral) de lobo marino de California ($n=2$) se recolectaron a partir de organismos muertos en estado de descomposición temprana, menor a 24 horas (Fig. 5) (Moore et al. 2015). Para ello, se realizaron monitoreos a pie dentro de la lobera en Los Islotes, Isla Espíritu Santo, La Paz, Baja California Sur, en colaboración con personal del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (IPN-CICIMAR) (permiso de colecta SPARN/DGVS/07012/23). Al momento de avistar un cadáver se determinó el estado de descomposición (escala 1-5) de acuerdo con características físicas como heridas, fracturas, olor, coloración, quemaduras de sol y depredación por carroñeros. Durante la evaluación se consideró la exposición del cadáver a condiciones ambientales (marea) y la posición del cuerpo (de cúbito ventral o dorsal/izquierda o derecha) (Pugliares et al. 2007). Previo a la toma de muestras, se registró la categoría de edad y sexo del organismo, así como datos de condición corporal (emaciado, flaco o robusto). Utilizando guantes y un bisturí, se realizó una incisión en la línea media, desde la quijada hasta las costillas, separando piel y grasa del músculo. Una vez expuesto el músculo, se tomó una biopsia de aproximadamente 3 gramos con ayuda de una pinza de disección.

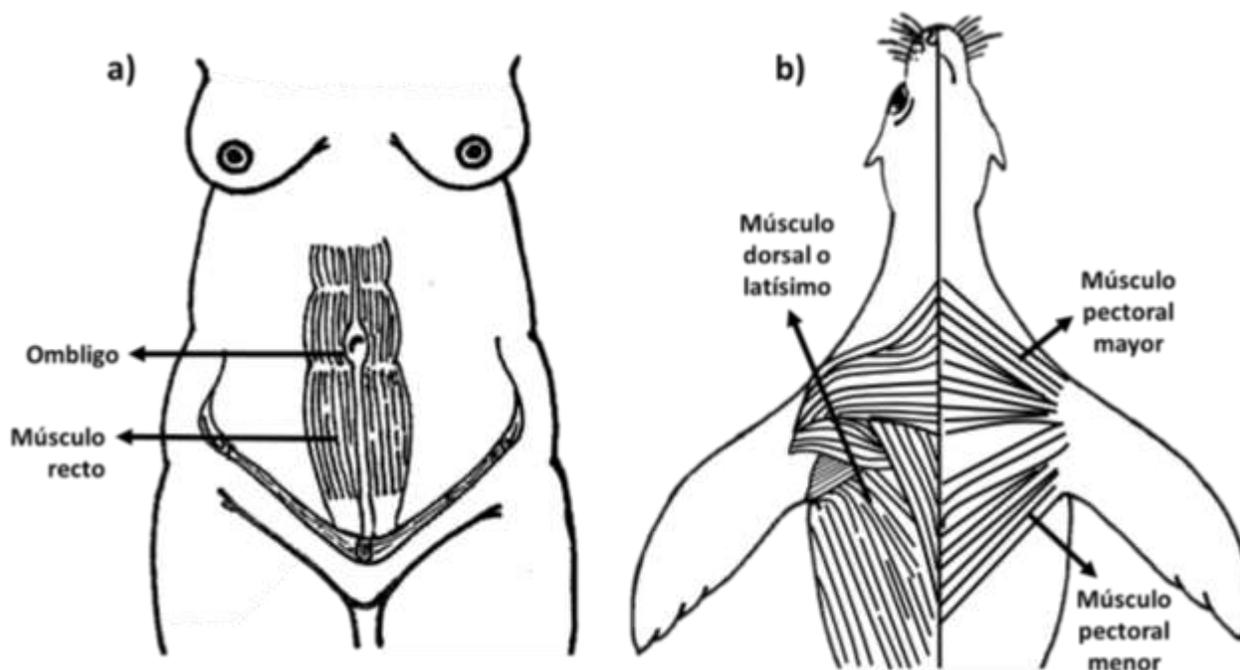


Figura 5. Representación gráfica del sistema muscular de (a) humano (*Homo sapiens sapiens*) y (b) lobo marino de California (*Zalophus californianus*) referente a la toma de muestras.

Todas las muestras fueron colocadas inmediatamente en tubos tipo Falcon® (50 mL) con medio de transporte (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, F-12 de Ham (DMEM/F-12), 1X; penicilina-estreptomicina, 10 U mL⁻¹) a 4°C, y posteriormente transportadas al Laboratorio de Estrés Oxidativo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).

Una vez en el laboratorio, la solución de transporte se descartó recuperando el fragmento de tejido en un nuevo tubo tipo Falcon™ (15 mL). Para limpiar cada muestra, se realizaron lavados con 10 mL de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS, Gibco™) a 25°C agitando la muestra por 2 minutos. Los lavados con PBS tienen por objetivo eliminar el exceso de lípidos, células sanguíneas y bacterias que acompañan a la muestra (Mojica et al. 2015).

Al finalizar el lavado, la muestra se colocó en una caja tipo Petri con 10 mL de PBS (25°C), se procedió a lavar la muestra en la solución (con agitación leve) y se descartó el PBS remanente. Las muestras fueron disectadas utilizando un bisturí hasta generar fragmentos de 0.5-1.0 mm² (Freshney 2016). Durante la disgregación mecánica del tejido, el músculo fue aislado del tejido adiposo, conectivo y pequeños coágulos. Los restos de tejidos fueron desechados en

cumplimiento con la Norma Oficial Mexicana (NOM-087-ECOL-SSA1-2002) sobre el manejo de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI) (DOF 2003).

6.2 Cultivo de músculo esquelético

Una vez macerado el tejido, se sembró distribuyendo los fragmentos en cajas T de 12.5 cm² (25 mL) con ayuda de una pipeta Pasteur. Cada cultivo inició con aproximadamente 500 mg de muestra (peso húmedo). Posterior a la siembra, se descartó el exceso de PBS y se adicionó 1 mL de medio de cultivo (DMEM/F-12, 1X; suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), 12.4% o suero bovino cósmico (CCS, por sus siglas en inglés), 12.4% en el caso de mamíferos marinos; penicilina-estreptomicina, 10 U mL⁻¹; L-glutamina-L-alanina (Glutamax), 100X; piruvato de sodio, 100 mM; ácido sulfónico (HEPES), 1 M). Los cultivos fueron incubados por 24 h a 35 ± 1°C en ambiente con CO₂ al 5% (v/v) (Barnstead Lab-Line Lli CO₂, Thermo Scientific™, Nueva Jersey, Estados Unidos). Al finalizar el período de incubación, se añadieron 2 mL de medio de cultivo a cada muestra (volumen total por caja, V_T= 3 mL), incubando nuevamente bajo las condiciones previamente descritas. Se realizaron recambios totales de medio de cultivo cada 48-72 horas, acompañados de un monitoreo sobre el estado de los cultivos utilizando un microscopio invertido (Carl Zeiss Microscopy GmbH™, Axiovert 100, Nueva York, Estados Unidos) y el programa ZEN 2.0[®] (Carl Zeiss Microscopy GmbH 2011). El monitoreo incluyó el seguimiento de la propagación de las células, conteo celular, estimación empírica de la confluencia (porcentaje de cobertura), diferenciación de tipos celulares, identificación de contaminación por bacterias y registro fotográfico de las células.

Al alcanzar una confluencia del 10% (>1000 células adheridas), las células fueron transferidas a nuevas cajas T de 12.5 cm² (25 mL) como un primer subcultivo descrito a continuación. El medio de cultivo de cada caja fue descartado para posteriormente realizar 2 lavados con PBS (2 mL). Se añadió 1 mL de tripsina-EDTA (1X) a cada muestra, seguido de una incubación por 5 minutos a 37°C. La tripsina hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas al exterior de las células por lo que promueve su disgregación (Freshney 2016). Luego de la incubación, la tripsina fue inactivada con 2 mL de medio de cultivo. Las células de todas las cajas T sembradas para cada muestra (individuo) fueron recuperadas en un solo tubo tipo Falcon™ (15 mL). Esta muestra fue

centrifugada a $100 \times g$ por 5 minutos a 25°C , descartando el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 2 mL de medio de cultivo. El volumen total de la muestra fue sembrado en cajas T de 12.5 cm^2 (25 mL), incrementando el número inicial de cajas. Los cultivos resultantes fueron incubados bajo las condiciones previamente descritas. Luego de 24 horas, se agregó 1 mL de medio de cultivo a cada caja alcanzando un total de 3 mL por muestra. Los cultivos se mantuvieron en incubación en las mismas condiciones hasta alcanzar un 90-100% de confluencia, momento en el que fueron transferidos a cajas T de mayor volumen (25 cm^2 , 75 mL). Se realizaron subcultivos hasta obtener un total de 18 cajas T sembradas por individuo con una densidad de $0.8-1 \times 10^6$ células mL^{-1} , equivalente al 90-100% de confluencia. La densidad celular durante cada pase fue estimada a través del método cuantitativo de viabilidad celular.

6.2.1 Viabilidad celular

Al momento de sembrar las células en nuevas cajas T, se recuperó una alícuota de 50 μL de cada muestra en un tubo tipo Eppendorf™ (200 μL) para proceder al análisis de exclusión con azul de tripano. La viabilidad celular fue evaluada bajo el principio de exclusión de captación, considerando que el colorante azul de tripano no puede difundirse a través de membranas íntegras y, por lo tanto, sólo es capaz de teñir células muertas (Ehrlich 1904). Considerando un factor de dilución (FD) de 1:2, se mezclaron 33 μL de muestra, 14 μL de PBS y 53 μL de azul de tripano (0.4%, Gibco™). La solución fue homogenizada e incubada a temperatura ambiente (25°C) por 5 minutos. Posteriormente, se descargaron 10 μL de la suspensión en una cámara Neubauer y, utilizando el objetivo 10X, se cuantificaron las células en un microscopio óptico (Leica Microsystems). El conteo de células vivas (C_V) y muertas (C_M) en cada muestra se realizó por triplicado, dentro de los cuadros exteriores (1 mm^2), considerando únicamente aquellas células que se encontraron dentro de los límites del polígono. La viabilidad celular, expresada como porcentaje ($\%V_C$), fue determinada a partir de la ecuación 1 (Louis y Siegel 2011):

$$\%V_C = \frac{C_V}{C_T} \times 100 \quad (1)$$

Donde C_V se refiere al número de células vivas y C_T al número de células totales. El valor de C_T se obtiene a partir de la concentración celular (C_C) y el volumen total (V_T en mL) de la muestra original (ecuación 2) (Louis y Siegel 2011):

$$C_T = C_c \times V_T \quad (2)$$

La concentración celular se obtuvo a partir de la siguiente fórmula (ecuación 3) (Louis y Siegel 2011):

$$C_c = \left(\frac{C_v}{N_c} \right) \times 10,000 \times FD \quad (3)$$

Donde N_c representa el número de cuadrantes contabilizados ($N_c=4$) y FD se refiere al factor de dilución.

6.3 Determinación de la concentración para exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) de cultivo primario de células musculares

Para establecer la concentración de DEHP a la cual la viabilidad del cultivo primario de células musculares de humano se compromete, se realizaron bioensayos utilizando distintas concentraciones teóricas de DEHP (10, 100, 200 y 1000 μM) por 15 días. La concentración teórica fue estimada de acuerdo con la relación v/v de DEHP disuelto en FBS y medio de cultivo (Jones et al., 1975; Li et al., 2015). Se ha observado que la concentración inicial de DEHP en solución no se mantiene al disolverlo en un medio y, por lo tanto, se espera que a partir de soluciones madre de 50 μM , 100 μM , 200 μM y 6000 μM , el DEHP parcialmente disuelto corresponda aproximadamente al 15% de la concentración inicial y puede estimarse por medio de la ecuación 4 (Jones et al., 1975; Li et al., 2015):

$$[DEHP]_{disuelto} = 0.1528x + 1.5263, \quad R^2 = 0.96, \quad p = 0.021 \quad (4)$$

Donde x representa la concentración de DEHP de la solución madre.

Al estimar la viabilidad de los cultivos, se observó que, a una concentración teórica de 925 μM , el 60% de las células estaban muertas entre los 10 y 13 días de exposición a DEHP. Tomando en cuenta que el coeficiente de difusión (D_{app}) del DEHP en medio es $4.04 \times 10^{-7} \text{ cm min}^{-1}$ (Hara 1993; Bernard et al. 2021), se consideró que la concentración de DEHP disuelto es de aproximadamente 1 mM. Entendiéndose por DEHP disuelto a la porción del ftalato que entra en contacto con el cultivo celular y puede ser absorbido por las células. Para efectos del presente estudio, se utilizó únicamente la concentración 1 mM (1000 μM) de DEHP para los bioensayos estableciendo un tiempo de exposición de 13 días.

6.4 Tamaño de muestra

Se estimó el tamaño de muestra óptimo requerido para tener un 80% de probabilidad de encontrar un resultado significativo, con un nivel de significancia de 0.05 y un poder estadístico de 0.8, utilizando la prueba *t de Student* para muestras independientes (Cohen 1988; Leongómez 2020). El poder estadístico seleccionado nos indica el 80% de probabilidad de que una muestra elegida al azar del grupo de cultivos expuestos a DEHP tenga una puntuación significativamente distinta ($\alpha=0.05$) a la de una muestra elegida al azar del grupo control (Leongómez 2020). El tamaño del efecto (d de Cohen = 0.8) nos habla de la diferencia de medias estandarizadas de los grupos, es decir, cuántas desviaciones estándar de diferencia hay entre los resultados de los dos grupos que se comparan (Correll et al. 2020).

6.5 Bioensayos de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) de células musculares en cultivo primario

Una vez alcanzada la confluencia necesaria (90-100%), se tomaron 5 cajas T como controles (sin DEHP) y 13 cajas T con exposición a DEHP por individuo y por especie. Para este último caso, las células musculares fueron expuestas a una concentración de 1 mM de DEHP durante 13 días.

Durante el bioensayo, se realizaron recambios totales de medio experimental para las exposiciones con DEHP y de medio de cultivo para los controles cada 72 horas. En cada recambio se monitoreó la confluencia de las células y se recopilaron evidencias fotográficas de cada caja T, obteniendo un mínimo de 3 imágenes por caja, en cuadrantes tomados de manera aleatoria utilizando un microscopio invertido y el programa ZEN 2.0[®], para evaluar los cambios morfológicos celulares y la abundancia de células satélite (ver sección 7.3.2). Al finalizar el bioensayo, se tomaron 3 cajas con DEHP para el análisis de expresión de enzimas, preservándolas en RNAlater[®] (Invitrogen[™], Carlsbad, California) (ver sección 7.3.5). Las cajas restantes se dividieron en 5 viales correspondientes a cada cultivo control ($n=5$) y DEHP ($n=5$). A partir de estas últimas muestras, se tomó una alícuota de 33 μ L de cada grupo (control y DEHP) por cada individuo y especie para estimar la viabilidad celular final (a los 13 días). El remanente de células en cada caja T (réplicas) de las condiciones de cultivo control ($n=5$) y con DEHP ($n=5$) fueron recuperadas en tubos tipo Eppendorf (1.5 mL) y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

6.5.1 Cambios en la morfología, proliferación y capacidad regenerativa de las células de músculo esquelético en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

A partir del registro fotográfico, se seleccionaron las imágenes de acuerdo con los siguientes parámetros: calidad, iluminación, contraste, resolución y ruido; todas las imágenes se almacenaron en formato JPEG (5 mp, 96 ppp) incluyendo una escala de referencia. Las imágenes que cumplieron con los parámetros de calidad fueron usadas para posteriores análisis incluyendo la identificación de cambios en la morfología celular, frecuencia de células satélite y abundancia celular (Mueller et al. 2006; Snijders et al. 2015).

Los parámetros estructurales a considerar para la descripción de los cambios morfológicos entre grupos control y exposición a DEHP fueron (1) pérdida de volumen celular (plasmólisis), (2) producción de cuerpos de estrés (Ravel-Chapuis et al. 2016), (3) confluencia, y (4) cambios estructurales en la membrana nuclear (Ye et al. 2017) (Fig. 6).

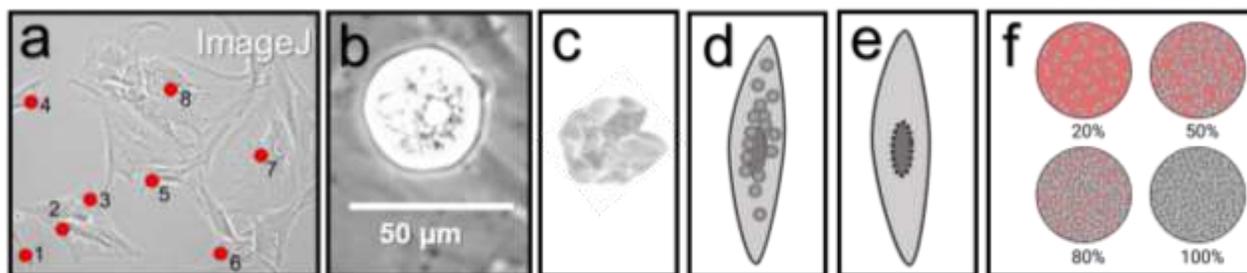


Figura 6. Ejemplificación de los cambios en abundancia celular y parámetros estructurales observados en cultivos primarios de células musculares de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos a una concentración de 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) por 13 días. (a) Muestra la abundancia de células musculares en cultivo primario; (b) ejemplo de una célula satélite turgente en condiciones control; (c) deformación de la membrana donde puede apreciarse una pérdida de volumen con respecto a las células control, la apariencia de las células plasmolizadas es rugosa y en algunos casos pierden la capacidad de adherencia a la base de la caja de cultivo. (d) Representación gráfica de los cuerpos de estrés; se observan como pequeños gránulos en el citoplasma, principalmente rodeando al núcleo. (e) Representación gráfica de la pérdida de la integridad de la membrana nuclear en cultivos expuestos a DEHP. (f) Esquema de la evaluación de la confluencia celular, determinada considerando el porcentaje de cobertura celular en el área de superficie adherente de la caja de cultivo.

La proliferación celular fue cuantificada considerando la abundancia de células musculares como un indicador del crecimiento de la población celular. Para ello, se estimó la abundancia de

células por cuadrante fotográfico utilizando el programa ImageJ (Schneider et al. 2012). Con base en la escala de referencia y la resolución de las fotografías, se estimó que 574 píxeles de la imagen vista al objetivo 20X corresponden a 0.02 cm. El total de células obtenidas por caja T fue calculado extrapolando el total de células contadas por cuadrante (0.006 cm^2) al total de superficie de cultivo de cada caja T (25 cm^2). La abundancia celular fue estandarizada por caja y por individuo. El promedio de células cuantificadas por día por especie se reportó como células de músculo esquelético totales en $25 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$.

La capacidad de regeneración del músculo esquelético fue estimada en términos de la frecuencia absoluta de las células satélite de humano y lobo marino de California (Yin et al. 2013) presentes en los 25 cm^2 de cada caja T por individuo. Para ello, se consideró que una alta frecuencia de células satélite se encuentra relacionada a un mayor potencial de las células musculares a ser resilientes ante la exposición a DEHP por 13 días. Dentro de la estimación, se contabilizaron únicamente aquellas células satélite que mantenían su forma esférica (aún no diferenciadas) (Kolanowski et al. 2020). Los valores de frecuencia absoluta obtenidos para los cultivos de células musculares en ambas especies bajo condiciones control y expuestas a DEHP fueron divididas en dos grupos con base en el tiempo de exposición; el primer grupo correspondió a la primera semana (días 1-7) de exposición a DEHP, mientras que el segundo grupo correspondió a la segunda semana (día 8-13) de exposición.

6.5.2 Biomarcadores

Previo a su procesamiento, las muestras y las soluciones utilizadas para el análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes se mantuvieron en hielo, a excepción de la solución amortiguadora de fosfatos, la cual se mantuvo a temperatura ambiente. Todos los análisis bioquímicos se hicieron por triplicado, por individuo y por especie. Para estandarizar los resultados de las variables de estudio se cuantificó la concentración de proteínas totales (proteína por mg mL^{-1}) de cada muestra utilizando el kit de Bio-Rad[®] adaptado a microplaca (Bradford 1976). Las muestras fueron analizadas en un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific) y se registró la absorbancia a 620 nm de (A_{620}).

6.5.2.1 Producción de especies reactivas y marcadores de daño oxidativo

6.5.2.1.1 Producción de radical superóxido

La tasa de producción de $O_2^{\bullet -}$ se cuantificó siguiendo el método de Persky et al. (2000). Se colocaron alícuotas (10 μ L) por triplicado de cada réplica de los cultivos control y con DEHP en tubos tipo Eppendorf. A cada tubo con muestra se le adicionaron 100 μ L de solución amortiguadora de Krebs (estabiliza la presión osmótica de las células), 100 μ L de citocromo C (1X) y se incubaron a 37°C en baño de María por 15 min con agitación. Los tubos se colocaron en agua fría y se les añadieron 100 μ L de N-etilmaleimida (1X) para evitar que el citocromo C continúe reduciéndose. Las muestras se mezclaron en vortex y centrifugaron a 805 x g por 10 min a 4°C. A partir de cada tubo, se transfirieron 250 μ L del sobrenadante a una microplaca y se registró la absorbancia a 550 nm por espectrofotometría. En el caso de los controles se siguió el mismo procedimiento invirtiendo el orden de adición de solución amortiguadora de Krebs, N-etilmaleimida (1X) y citocromo C (1X). La tasa de producción $O_2^{\bullet -}$ se expresa en nanomoles de $O_2^{\bullet -}$ por miligramo de proteína por minuto (ecuación 5).



6.5.2.1.2 Peroxidación de lípidos

Se cuantificó el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como indicador de daño oxidativo a lípidos de acuerdo con la técnica descrita por Persky et al. (2000) con modificaciones. De cada réplica de los cultivos control y con DEHP, se tomaron 100 μ L de células en solución, se homogenizaron en frío en una solución de NaCl al 0.9% a 12,879 x g en un equipo Polytron™, se centrifugaron a 805 x g por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual permaneció en frío hasta su análisis. Se prepararon diluciones de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) para construir una curva estándar de 0 a 5 nmol 250 μ L⁻¹. Cada muestra y cada punto de la curva estándar se mezcló con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 mM) en un vial y se incubó a 37°C durante 15 min. Posteriormente, los viales se mantuvieron en frío (4°C), deteniendo la reacción con ácido tricloroacético (TCA, 0.76 M en HCl 1M) al 20% y ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%. Se homogenizaron las mezclas de reacción utilizando vórtex, y se

incubó a 90°C en baño María (Precision, Thermo Scientific, Waltham, M. A., EUA) con agitación durante 10 min y, después a 4°C por 5 min. Los viales fueron centrifugados a 805 x *g* durante 15 min a 4°C, al finalizar, el sobrenadante (200 µL) de cada vial fue recuperado y transferido a una microplaca. Se registró la absorbancia a 532 nm y, utilizando el valor de la curva estándar (ecuación 6), se obtuvo la concentración de TBARS (nmol TBARS mg⁻¹ proteína) de cada muestra.

$$A_{532} = m * TEP + b \quad (6)$$

En donde A_{530} es la absorbancia a 532 nm para cada muestra, TEP es la concentración de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en la curva estándar, m es la pendiente y b es la ordenada al origen.

6.5.2.1.3 Carbonilos proteicos

Se cuantificaron los niveles del complejo formado por derivados de carbonilos proteicos y 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH) como indicador del daño oxidativo a proteínas. El complejo se precipita en presencia de ácido tricloroacético (TCA) (Stadtman y Levine 2006). En tubos tipo Eppendorf® se colocaron 250 µL de muestra en pozos de una microplaca, adicionando DNPH (10 mM en HCl 2 M). Las muestras se incubaron por una 1 hora a 25°C con agitación constante. Se añadió TCA (20%) a todos los tubos y se centrifugaron a 23895 x *g* a 25°C por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con etanol y acetato de etilo (1:1). Para desnaturalizar las proteínas se adicionó cada tubo con clorato de guanidina (6 M), incubándose a 37°C por 15 minutos. Las muestras se transfirieron a una microplaca y fueron leídas en un lector de microplaca a 370 nm. La concentración de carbonilos proteicos se expresó en micromoles (µmol) por miligramo de proteína.

6.5.2.2 Enzimas antioxidantes

6.5.2.2.1 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad catalítica de SOD (EC 1.15.1.1) en cada réplica de las células musculares mantenidas bajo condiciones control ($n=5$) y después de la exposición a DEHP ($n=5$) se cuantificó de acuerdo con el protocolo descrito por Suzuki (2000) adaptado a microplaca. Brevemente, la metodología

se basa en la reducción del nitroazul de tetrazolio por acción del radical $O_2^{\bullet-}$ producido por el sistema xantina/ xantina oxidasa. A partir de esta reacción se forma el compuesto formazán que puede detectarse en un rango de longitud de onda de 550 a 600 nm por espectrofotometría; la inhibición de la reducción del nitroazul de tetrazolio está dada por la acción de la enzima SOD, la cual dismuta al $O_2^{\bullet-}$ transformándolo en H_2O_2 . Para cuantificar la actividad de SOD, cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y con DEHP ($n=5$) fue diluida 1:10 (v/v) con solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, nitroazul de tetrazolio 1 mM). Se tomaron 10 μ L de cada dilución y se cargaron en microplaca. Cada pozo se adicionó con solución de trabajo de carbonato de sodio (50 mM, xantina 0.1 mM, nitroazul de tetrazolio 0.025 mM, EDTA 0.1 mM) y xantina oxidasa (0.1 U mL^{-1} en sulfato de amonio 2 M). Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría a 560 nm, registrando la absorbancia inicial y posteriormente cada minuto durante 5 minutos para calcular el cambio de absorbancia a 560 nm por unidad de tiempo (ΔA_{560}). Se define como una unidad de actividad de SOD a la cantidad necesaria de enzima para inhibir la reacción entre el $O_2^{\bullet-}$ y el nitroazul de tetrazolio (NBT) en un 50%. La actividad de esta enzima se expresa en unidades de SOD por miligramo de proteína (U mg^{-1} proteína).

6.5.2.2.2 Actividad de catalasa (CAT)

Se determinó la actividad catalítica de la enzima CAT (EC 1.11.1.6) en cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y DEHP ($n=5$), de acuerdo con el protocolo descrito por Aebi (1984) por espectrofotometría. Brevemente, se siguió la desaparición de H_2O_2 , sustrato de la enzima CAT. Para ello, cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y con DEHP ($n=5$) fue diluida 1:10 (v/v) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7). Se cargaron los pozos de la microplaca con 10 μ L de muestra de cada dilución y se adicionaron con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M) y solución de H_2O_2 (20 mM). Se analizó por espectrofotometría, registrando la absorbancia inicial a 240 nm y posteriormente cada minuto durante 5 minutos, para calcular el gradiente de absorbancia a 240 nm por minuto (ΔA_{240}). Una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de H_2O_2 en un minuto. La actividad de esta enzima se expresa en unidades de CAT por miligramo de proteína (U mg^{-1} proteína).

6.5.2.2.3 Actividad de glutatión-disulfuro reductasa (GR)

Se estimó la actividad catalítica de GR (EC 1.8.1.7) en cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y DEHP ($n=5$), de acuerdo con el protocolo descrito por Goldberg y Spooner (1987) adaptado a microplaca. Se siguió la oxidación del cofactor NADPH a nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NADP⁺). Cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y con DEHP ($n=5$) fue diluida 1:10 (v/v) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7). Se cargaron los pozos de la microplaca con 10 μ L de muestra diluida y se adicionaron con solución amortiguadora de fosfatos (500 mM), EDTA (50 mM), NADPH (2 mM), agua desionizada y glutatión reducido (GSSG, 10 mM). Se analizó por espectrofotometría, registrando la absorbancia inicial a 340 nm y posteriormente cada minuto durante 5 minutos, calculando al final el cambio en la absorbancia por unidad de tiempo (ΔA_{340}). Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima que, en un minuto a 25°C, oxida 1 nmol de NADPH para formar el producto NADP⁺. Los resultados se expresan en unidades de GR por miligramo de proteína (U mg⁻¹ proteína).

6.5.2.2.4 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

Se determinó la actividad catalítica de la enzima GPx (EC 1.11.1.9) en cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y DEHP ($n=5$), de acuerdo a la metodología propuesta por Flohé y Günzler (1984) adaptada a microplaca. Brevemente, se siguió la desaparición de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) en presencia de H₂O₂, sustrato de esta enzima. Cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y con DEHP ($n=5$) fue diluida 1:10 (v/v) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7). Se cargaron los pozos de la microplaca con una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos (500 mM), EDTA (50 mM), azida de sodio (NaN₃, 20 mM), solución de H₂O₂ (10 mM) y alíquotas de 10 μ L de cada muestra diluida. Se registró la absorbancia a 340 nm cada minuto por 5 minutos y se calculó el cambio en la absorbancia por unidad de tiempo (ΔA_{340}). Una unidad de GPx es la cantidad de enzima necesaria para oxidar un mol de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) por minuto. Los resultados se expresan en unidades de GPx por miligramo de proteína (U mg⁻¹ proteína).

6.5.2.2.5 Actividad de glutatión S-transferasa (GST)

Se cuantificó la actividad catalítica de GST (EC 2.5.1.18) en cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y DEHP ($n=5$), de acuerdo con el protocolo descrito por Habig y Jakoby (1981) adaptado a microplaca. Brevemente, se siguió la aparición del tioéter glutatión dinitrobenzeno, producto de la reacción de GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) catalizada por GST. Cada réplica de los cultivos control ($n=5$) y con DEHP ($n=5$) fue diluida 1:10 (v/v) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7). Se cargaron los pozos de la microplaca con 10 μ L de muestra diluida y se adicionaron con solución amortiguadora de fosfatos (100 mM), GSH (1 mM), EDTA (60 mM) y CDNB (10 mM). Se analizó por espectrofotometría, registrando la absorbancia inicial a 340 nm y posteriormente cada minuto durante 5 minutos, para calcular el cambio en la absorbancia por unidad de tiempo (ΔA_{340}). Una unidad de esta enzima corresponde a la cantidad de GST necesaria para catalizar la conjugación de 1 μ mol de CDNB por minuto a 25°C. Los resultados se expresan en unidades de GST por miligramo de proteína ($U\ mg^{-1}$ proteína).

6.5.2.3 Expresión génica de enzimas, genes de referencia y marcadores de muerte celular

6.5.2.3.1 Extracción de ARN

Las muestras fueron homogenizadas utilizando un sonicador durante 5 segundos, 4 veces. Se tomaron 100 μ L de cada muestra y se transfirieron a nuevos viales. Se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) contenido en las células de músculo esquelético bajo condiciones control ($n=5$) y después de la exposición a DEHP ($n=5$) utilizando el reactivo TRIzol™ Reagent siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen™, E.U.A.). La concentración y pureza de las extracciones se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™, E.U.A.) con una absorbancia de 260/280 nm.

6.5.2.3.2 Purificación y retrotranscripción

Los productos de extracción fueron tratados con DNAasa I (Life Technologies, E.U.A.) antes de proceder a la síntesis de ADN complementario (ADNc). En este último paso el ARN extraído es

usado como plantilla (templete) para sintetizar ADNc bajo la técnica de transcripción inversa utilizando el kit ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega™, E.U.A.) con el oligo dT15 de 500 ng de ARN. Para las reacciones se utilizaron $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de ARN por muestra siguiendo el protocolo del fabricante.

6.5.2.3.3 Diseño de primers

Se tomaron como referencia los genes de la base de datos *Nucleotide* (NT) de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); esta base cuenta con la información génica contenida en GenBank®. A partir de las secuencias de ADN correspondientes a los genes de interés (Tabla 5) se seleccionaron únicamente aquellas regiones codificantes para cada gen (CDS, en formato FASTA). En el caso de las muestras de humano, se utilizaron los identificadores de cada secuencia (GI) de NCBI en la plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) para obtener las regiones codificantes. En el caso de las muestras de lobo marino de California, se utilizaron las secuencias obtenidas de la base de nucleótidos en el buscador de marcos de lecturas abiertas *open reading frames finder* (ORF finder) de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) para identificar segmentos potenciales de codificación de proteínas. En este último caso, se eligieron los ORF de mayor longitud (pares de bases) para continuar con el diseño de oligos. Se procedió al diseño de los oligos en el programa Primer3Plus (Untergasser et al. 2012) (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), utilizando los parámetros de termodinámica de SantaLucía (1998) y la corrección de iones de sodio de Owczarzy et al. (2004). Se confirmó la ausencia de sitios alternativos en la plantilla donde el oligo pueda hibridarse o formar estructuras secundarias. Para ello, se utilizaron el programa RNAfold web server (Lorenz et al. 2011) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) y la plataforma Oligoevaluator™ (Sigma-Aldrich®, E.U.A) (<http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet>). Se consideró la energía libre del ensamble termodinámico menor a -1; un contenido de C/G entre 40 y 73%; una temperatura de fusión (T_m) entre 55 y 70°C, de manera que esté por arriba de la temperatura de apareamiento (*annealing*); y una longitud del oligo entre 18 y 27 pares de bases (pb). Finalmente, se utilizó el programa Primer-BLAST (Ye et al. 2012) para confirmar la T_m de los

oligos e identificar posibles inespecificidades. En los casos donde se presentaron diferentes variantes de las isoformas de un gen, se utilizó el programa Clustal Omega (Sievers et al. 2011) para alinear las secuencias y seleccionar aquella región conservada entre las variantes para ser utilizada dentro del diseño de los oligos. Finalmente, a partir del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) obtenido de la retrotranscripción, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final (Anexo C) para validar la detección específica de cada primer utilizando el kit Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, E.U.A.). La confirmación visual se realizó en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 5. Oligos diseñados para el análisis de la expresión génica en células de músculo esquelético de humano (H; Homo sapiens sapiens) y lobo marino de California (LMC; Zalophus californianus) en cultivo primario.

Sp	Gen	Oligo (5'-3')	Tm °C	Longitud (pb)	Producto (pb)
H	Superóxido dismutasa 1	F_CAGTGAAGGTGTGGGGAAG R_CAGTCACATTGCCCAAGTCT	60 60	19 20	183
H	Superóxido dismutasa 2	F_GCCTACGTGAACAACCTGA R_TCCAGCAACTCCCCTTTG	60 60	19 19	189
H	Superóxido dismutasa 3	F_CGAGACATGTACGCCAAGGT R_CTCCAGGGCGAAGAAGGC	60 60	20 18	195
H	Catalasa	F_AAAGCTGATGTCCTGACCACT R_AACTCTCTCAGGAATTCTCTCTCG	60 60	21 24	153
H	Glutación reductasa	F_TATGTGAGCCGCTGAATG R_TTATTCTAAGCTGGCACCG	60 60	19 20	211
H	Glutación peroxidasa 1	F_AGAAGTGCAGGTGAACG R_ATGTCAATGGTCTGGAAGCG	60 60	18 20	226
H	Glutación peroxidasa 2	F_GCTCCCTACCCTTATGATGACCCA R_TTGATGGTTGGGAAGGTGCG	63 63	23 20	165
H	Glutación peroxidasa 3	F_CACCATTACGAGTACGGAG R_CAGAATGACCAGACCGAATG	60 60	20 20	178
H	Glutación peroxidasa 4	F_CTGTGGAAGTGATGAAGAT R_GGCAGGTCCTTCTCTATCA	60 60	20 19	155
H	Glutación peroxidasa 7	F_CTGACAGCAACAAGGAGATT R_ACCTCCTCCACTGACACA	60 60	20 18	223
H	Glutación peroxidasa 8	F_CCTCTTGACGCTTACCCG R_AGTCACTGGCCACGTTTAC	60 60	18 19	229
H	Glutación S transferasa alpha 4	F_AGACGCGAAATTGGGACTGT R_TTCTTCATCAAACCTCGACTCCG	59 59	20 22	172
H	Glutación S	F_TCCAGGTCTGCTTCCCCG	60	18	214

	transferasa kappa 1	R_CCAGACGCGCATCCACAG	60	18	
H	Glutación S	F_AAAGAAGTACACGATGGGGG	60	20	128
	transferasa miu 1	R_TCTGGGTGATCTTGTGAGC	60	19	
H	Glutación S	F_AGGCGGGCAAGGATGACTATG	60	21	212
	transferasa pi 1	R_GCGCCCCACATATGCTGAGAG	60	21	
H	Glutación S	F CTCACCCTTGACCCGTCTCT	60	19	191
	transferasa theta 1	R_GTGTGCATCATTCTCATTGTGGC	60	23	
H	Glutación S	F_TAGAACGTGTACGCAGAGCC	60	20	142
	transferasa microsomal 1	R_TAGATCCGTGCTCCGACAAA	60	20	
H	Glutación S	F_CTGCCCGTTTGCTGAGAG	60	18	211
	transferasa omega 1	R_CTTCTTCCCTGGGTATGCTTCA	60	22	
H	Glutación S	F_AAAGAAGAGGGCCAGCGTG	60	19	233
	transferasa zeta 1	R_CCACCTGAGGCACCAAGC	60	18	
H	PPAR alpha	F_CGAGGCCGGCGATCTAGA	60	18	238
		R_AGACTCGTCCACGCTGCC	60	18	
H	PPAR delta	F_GCACTTCTTCCAGCAGC	59	18	169
		R_CACATGCATGAACACCGTAGT	59	21	
H	Beta actina	F_GACAGGATGCAGAAGGAGA	60	19	151
		R_CCTGCTTGCTGATCCACAT	60	19	
H	GAPDH	F_TCCACTGGCGTCTTCACC	60	18	176
		R_CAGTTGGTGGTGCAGGAG	60	18	
H	Caspasa 3	F_AAACCTTTTATTTCAGGCCTGCC	60	25	196
		R_CACAAAGCGACTGGATGAACC	60	21	
H	Factor nuclear eritroide 2	F_ATGAACGTCGGGCCTTGG	61	18	163
		R_GCTGCCACCTTGTTTTGC	61	20	
H	Peroxisredoxina 1	F_CCCACGGAGATCATTGCTT	60	22	176
		R_GTGCGCTTCGGGTCTGAT	60	18	
H	Interleucina 6	F_CTCCTTCTCCACAAGCGCC	62	19	250
		R_GCCTCTTTGCTGCTTTCACA	62	20	
H	Interleucina 15	F_TCTTCATTTTGGGCTGTTTCAG	57	22	153
		R_TGCAACTGGGGTGAACATC	57	19	
H	Interleucina 16	F_AACGGCAAGTCTCTCAAGGG	61	20	143
		R_GCAGAGTCAGTGGAGGAGTTG	61	21	
H	8-Oxoguanina ADN glicosilasa	F_GACTACAGCTGGCACCCCTAC	64	20	187
		R_AACCTTTTCTGCGCTTTGC	64	19	
LMC	Superóxido dismutasa 1	F_TGGGCCAAATGATCAAGAGAGG	60	22	166
		R_GCCCAAGTCATCTCGTTTCTCG	60	22	
LMC	Superóxido dismutasa 2	F_AAGCACAGCCTCCCCGACT	60	19	156
		R_ACCCTTCTGCAGCGCCTC	60	18	
LMC	Superóxido	F_TTGGAAAGAGCTGGAAAGGTG	62	21	164

	dismutasa 3	R_ACTTTCTCGTGCATGTCGC	62	19	
LMC	Catalasa	F_AGAAACCTGATGTCCTGACCACC	60	23	201
		R_GCGTGACCTCGAAGTAGCCAA	60	21	
LMC	Glutación reductasa	F_CATCCCCACGGTCGTCTTC	60	19	130
		R_CGCGTGATACATCGGGGT	60	18	
LMC	Glutación peroxidasa 1	F_TCGGGCATCAGGAGAACG	60	19	213
		R_AGATGATGAACTTGGGGTCCGGT	60	22	
LMC	Glutación peroxidasa 2	F_GGAAGCCAAGAACCACCAGG	61	20	175
		R_TACGACCTCAGTGCCATCAG	61	20	
LMC	Glutación peroxidasa 3	F_CGTCCTGCCTTCTCTCCC	63	18	143
		R_GATGTACTCCTGCCCGTTGA	63	20	
LMC	Glutación peroxidasa 4	F_CTCGCGACCCGGAATAGC	64	18	120
		R_CATGTGTCCATCGATGCCTTG	64	22	
LMC	Glutación peroxidasa 7	F_GCAAGTTGGTGTCACTGGAGAAG	60	23	151
		R_GGGGAAGGCAAGCACATTGAAGT	60	22	
LMC	Glutación peroxidasa 8	F_CCTTCCATGCAATCAGTTCGG	60	22	226
		R_GACTTCACAACCTGGCCCTCAG	60	22	
LMC	Glutación S transferasa alpha 4	F_GTTGCTGAAGGATGGACGCT	61	20	130
		R_CAGGTCCTTCTCATACAAGTCGTA	61	24	
LMC	Glutación S transferasa kappa 1	F_TGTGCTGTCCCCCTACTCC	60	19	217
		R_CTTGGGGAACTGCACGGG	60	18	
LMC	Glutación S transferasa miu 5	F_TATGAGGAGAAAACAGTACACGTGC	60	24	196
		R_CTTCTCAGTCTCACCACACATATTG	60	26	
LMC	Glutación S transferasa pi 1	F_CAGCCAGCTCATCTATCGGA	59	20	147
		R_TCGGCGAAGGAGATCTGGT	59	19	
LMC	Glutación S transferasa theta 1	F_TGGCTGAATTGGATGTGACC	60	20	154
		R_CGACCTTCAAAGACTTGGCA	60	20	
LMC	Glutación S transferasa microsomal 1	F_ACAGATGACAGAGTGGAACGTG	60	22	155
		R_TAGATCCGTGCTCCAACAAAGA	60	22	
LMC	Glutación S transferasa omega 1	F_GTTCTGCCATTTCGCCCA	60	18	250
		R_TTGGCAAGCTTTCATAGGGG	60	22	
LMC	Glutación S transferasa zeta 1	F_TGCGCGTGATTTCCGATG	60	18	179
		R_CTCGTCTCCCACACAGTACT	60	20	
LMC	PPAR alpha	F_CCACAGGCTGCAGGGAAGG	63	19	166
		R_TGGGGAGAGGGGGCAAATC	63	19	
LMC	PPAR delta	F_CATGTCTTCTACCGCTGCCA	59	20	136
		R_CCTCATGCACACCGTACTTG	59	20	
LMC	Beta actina	F_GGGAAATCGTGCCTGACAT	60	19	184
		R_AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	60	20	

LMC	GAPDH	F_GAGAAAGCTGCCAAATATGACGAC	60	24	219
		R_GTTGCTGTAGCCGAATTCATTGTC	60	24	
LMC	Caspasa 3	F_GATGTAGATGCAGCAAACCTCC	62	22	158
		R_CTTAGAAGCACGCAAACAAACTG	62	24	
LMC	Factor nuclear eritroide 2	F_ACTTACTGCCCTGCTCAAT	63	20	233
		R_TCTTCTTGGGGCTGGGG	63	18	
LMC	Peroxisredoxina 1	F_CCCAACCTTCATAGCCACGGC	60	20	223
		R_ATGCCAGGTGACAGAAATGAGAATC	60	25	
LMC	Interleucina 6	F_GCTATGAACTCCCTCTCCGC	62	20	257
		R_AGTGCCTCCTTGCTGTCTTC	62	20	
LMC	Interleucina 15	F_CAAAGTAACAGCGATGAAGTGC	59	22	164
		R_CCTCACATTCTTTGCATCCCG	59	21	
LMC	Interleucina 16	F_CATTTCCAACGTCGTGCTGAT	61	21	230
		R_CTACCATTGTAAGAGCCTCGC	61	21	
LMC	8-Oxoguanina ADN glicosilasa	F_TACTGTTCAGTGCTGACCTGTG	59	22	111
		R_AACCCCTTTGTCCAGTGCC	59	19	

Sp, Especie; H, humano; LMC, lobo marino de California; Fw, oligo sentido; Rv, Oligo antisentido; pb, pares de bases; Tm, temperatura de fusión; PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; ADN, ácido desoxirribonucléico.

6.5.2.3.4 PCR en tiempo real por transcripción inversa (RT-qPCR)

A partir del ADNc obtenido de la retrotranscripción, se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para identificar los patrones de expresión génica de las células de músculo esquelético de humano y lobo marino de California en respuesta a la exposición a DEHP (1 mM por 13 días). Las reacciones se realizaron a partir de un volumen de 12.5 µL usando el kit 1x SsoFast EvaGreen SuperMix (Bio-Rad, E.U.A.) y se amplificaron en el equipo ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems™, E.U.A.). Los primers utilizados se muestran en la Tabla 5. Posterior a la amplificación, la especificidad de los productos se analizó a través de una curva de disociación, de la que se espera obtener una sola cresta correspondiente a la temperatura de fusión empleada. Los niveles de cada gen obtenidos fueron normalizados utilizando los genes de referencia de beta actina (ACTB) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se utilizó la ecuación 7 (Livak y Schmittgen 2001) para estimar la expresión relativa de cada gen dentro de los controles y exposición a DEHP para su comparación.

$$2^{-\Delta\Delta C_q} \quad (7)$$

Donde C_q o ciclo de cuantificación (por sus siglas en inglés), representa el punto en el cual la curva de amplificación alcanza el valor del umbral. Esta ecuación permitió calcular y evaluar el cambio en la expresión génica en las muestras tras la exposición a DEHP con respecto a las muestras mantenidas bajo condiciones control. Al expresar los resultados como el cambio de expresión, se puede cuantificar y comparar la diferencia en la expresión génica entre ambos grupos (Quackenbush 2002; Bernstein et al. 2006; Kuehn et al. 2008). Para esta estimación se considera que los valores obtenidos >1 indican un aumento en la expresión, mientras que los valores <1 indican una disminución en la expresión.

En los casos donde la baja detectabilidad de un transcrito pudiera estar relacionada con una baja concentración en las muestras, se realizó un qPCR anidado (Haff 1994). La qPCR anidada se utiliza para amplificar y detectar específicamente un fragmento de ADN o ARN de interés en una muestra (Manuel et al. 2021). Esta técnica se basa en la amplificación de la región de interés mediante una primera corrida de PCR, seguida de una segunda corrida utilizando los oligos que fueron diseñados dentro del producto de la primera amplificación. En ambos pasos de PCR se utilizaron las mismas condiciones aplicadas para el resto de los genes (Anexo D).

6.6 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico, se utilizó el programa RStudio 4.0.3 (RStudio Team 2020), la significancia estadística de los resultados fue evaluada utilizando un valor de α de 0.05 ($p < 0.05$). Para todas las variables respuesta se realizaron comparaciones entre condiciones de cultivo (control y exposición a DEHP 1mM por 13 días) para cada especie, y entre especies para cada condición, como se describe a continuación.

6.6.1 Proliferación celular y capacidad regenerativa

A manera de prospección, los datos de proliferación celular (abundancia o número de células musculares), fueron remuestreados utilizando el método “Bootstrap” con 1000 iteraciones por

réplica de cada individuo y especie (Efron y Tibshirani 1993). Lo anterior, con el fin de reducir el sesgo de observación inherente al análisis de las imágenes (Hall y Presnell 1999). Al comparar las distribuciones de los datos observados con los datos remuestreados (Bootstrap) no se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=2400$, $p=0.24$, humano; $\chi^2=407$, $p=0.35$, lobo marino). Por ello, se utilizaron los datos originales para los posteriores análisis. La abundancia celular en cada caja de cultivo fue tratada como una submuestra independiente de cada especie (humano y lobo marino de California).

Para detectar diferencias en la viabilidad celular (sección 6.2.1) entre las células de músculo esquelético mantenidas bajo condiciones control y aquellas expuestas a DEHP (1 mM por 13 días) para cada especie, se aplicó la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon (W) (Daniel y Cross 2014). De igual forma, se utilizó esta prueba para evaluar las diferencias en la frecuencia absoluta de las células satélite por semana, entre células mantenidas bajo condiciones control y aquellas expuestas a DEHP, para cada especie. La frecuencia absoluta de células satélite se utiliza como un indicador de la capacidad de regeneración celular del músculo esquelético (Schultz 1996).

Con el fin de modelar la proliferación de las células de músculo esquelético (sección 6.5.1) a distintos tiempos de exposición, se ajustaron modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) (Bates et al. 2015; Handayani et al. 2017) por condición de cultivo (control y DEHP) y por especie (*H. sapiens* y *Z. californianus*). Se consideró como la variable respuesta a la proliferación celular (abundancia) y como variable explicativa al tiempo de exposición del cultivo (13 días) de las condiciones de cultivo (control y DEHP 1 mM). Para ambas especies de estudio, se consideró excluir (||) el efecto aleatorio inherente a cada réplica biológica (individuo) durante la modelación (Tabla 6).

Tabla 6. Factores considerados en los modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) de la abundancia de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en cultivo primario bajo condiciones control y en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) (1 mM) por 13 días.

Modelo	Variable	Descripción de la variable	Ecuación del GLMM
Control	Respuesta o dependiente Explicativa o independiente	y: número de células x: días de exposición	$y \sim \beta_0 + \beta_1 x_1 + (x \text{individuo})$
DEHP	Respuesta o dependiente Explicativa o independiente	y: número de células x: días de exposición	$y \sim \beta_0 + \beta_1 x_1 + (x \text{individuo})$

Se consideró al número de células totales en $25 \text{ cm}^2 \text{ día}^{-1}$ como la variable dependiente continua (y). β_0 , pendiente; β_1 , ordenada al origen; x , días de exposición como efecto fijo; individuo, réplica biológica como efecto aleatorio.

Para la construcción de los modelos, se asumió una distribución gamma del número de células (y) con una función de enlace de identidad ($f(x)=x$) ya que ésta mostró el mejor ajuste para el modelo, sin diferencias significativas entre la distribución de los datos y la distribución gamma teórica ($\chi^2=32680$, $p=0.27$). La bondad de ajuste del modelo se realizó de acuerdo con el criterio de información de Akaike corregido (AICc), la pseudo R^2 Nagelkerke, así como su significancia de la prueba Chi cuadrada (χ^2) (Kabacoff 2015). Para esta estimación, cada GLMM es comparado con un modelo nulo el cual se encuentra anidado dentro de los modelos ajustados. Los resultados de los GLMM se presentan como medias y desviación estándar. Los coeficientes de las pendientes y constantes de cada modelo fueron contrastadas por medio de la prueba *t de Student* (Ferson y Burgman 2000) para evaluar las posibles diferencias entre las células de músculo esquelético en cultivo primario bajo condiciones control y aquellas expuestas a DEHP (1 mM por 13 días) por especie.

6.6.2 Indicadores de estrés oxidativo

Para cada variable se probaron los supuestos de normalidad (prueba de *Shapiro–Wilk*) y homocedasticidad (Prueba de *Levene*) (Hector 2015). Al no cumplirse los supuestos ($p<0.05$), se procedió a aplicar estadística no paramétrica. Con base en los resultados de la prueba de

Grubbs (Grubbs 1950), se eliminaron del análisis estadístico los valores extremos obtenidos para la producción de $O_2^{\bullet-}$, los indicadores de daño oxidativo (TBARS y carbonilos proteicos) y la actividad de las enzimas antioxidantes; éstos fueron sustituidos por medianas (5.5% de los datos de humanos, 5% de los datos de lobo marino) (Little y Rubin 2019). Para detectar diferencias en la producción de $O_2^{\bullet-}$, los niveles de TBARS y carbonilos proteicos, así como la actividad de las enzimas antioxidantes entre las células de músculo esquelético en cultivo primario bajo condiciones control y aquellas expuestas a DEHP (1 mM por 13 días), se aplicó la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon pareada para cada especie. Aquellos valores que se encontraron fuera del límite de detección para la producción de $O_2^{\bullet-}$ (<10% en ambas especies), fueron sustituidos por la mitad del límite de detección específico de esta variable (1989 EPA; Labrada-Martagón et al. 2011; Castillo-Castañeda et al. 2017).

6.6.3 Expresión génica

Se realizó una prueba Kruskal-Wallis, prueba no paramétrica para comparar k muestras independientes (Choi et al. 2003), para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de enzimas antioxidantes, factores de transcripción y citoprotectores entre las células de músculo esquelético en cultivo primario bajo condiciones control y aquellas expuestas a DEHP (1 mM por 13 días) para cada especie (Hollander y Wolfe 1973; Choi et al. 2003; Rask et al. 2014). Se estimó la tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés *false discovery rate*), con un valor del umbral de significancia corregida de 0.05 y 0.01 (Barbosa et al. 2009).

6.6.4 Evaluación de biomarcadores de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

Con el fin de identificar aquellos biomarcadores útiles para discriminar entre condiciones control y exposición a DEHP (1 mM), en cultivos primarios de músculo esquelético de humano y lobo marino de California, se calculó el índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR, por sus siglas en inglés *integrated biomarker response*) por especie. En la estimación se tomaron en cuenta la producción de $O_2^{\bullet-}$, los indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas (TBARS y

carbonilos proteicos, respectivamente), las actividades de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, GST, GR y CAT), y la expresión génica de la expresión génica de antioxidantes, marcadores de daño oxidativo (*SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *CAT*, *GR*, *GPx1*, *GPx2*, *GPx3*, *GPx4*, *GPx7*, *GPx8*, *GSTA4*, *GSTK1*, *GSTM5*, *GSTP1*, *GSTT1*, *MGST1*, *GSTO1*, *GSTZ1*, *PPARA*, *PPARD*, *CASP3*, *NRF2*, *PRDX1*, *OGG1*, *IL-6*, *IL-15* y *IL-16*), respuesta inflamatoria y muerte programada, utilizando el método desarrollado por Devin et al. (2014). El IBR es utilizado para evaluar el impacto combinado de múltiples biomarcadores en un organismo o sistema biológico. Se utiliza comúnmente en estudios de toxicología y ecotoxicología para determinar el nivel de respuesta general frente a la exposición a sustancias químicas o condiciones ambientales (Devin et al. 2014). El IBR combina la información de varios biomarcadores individuales en un solo valor numérico para cada condición de cultivo, lo que permite una evaluación más completa y global de la respuesta biológica. Cada biomarcador individual se mide y se le asigna un valor según el nivel de cambio con respecto a un control; los datos estandarizados correspondientes a cada muestra (Y) se calcularon de la siguiente manera:

$$Y = \frac{X - m}{sd} \quad (8)$$

Donde X representa la respuesta de cada biomarcador, m refiere a la media general de cada biomarcador y sd es la desviación estándar de cada biomarcador.

Cada valor Y fue multiplicado por 1 o -1 según se espere una activación o una inhibición de acuerdo con cada valor Y obtenido para producir el valor de Z :

$$Z = Y * [-1 | + 1] \quad (9)$$

Donde Z es un coeficiente de respuesta.

Posteriormente, se produce el valor estandarizado S del biomarcador utilizando los valores mínimos de cada Y :

$$S = Z + |Min| \quad (10)$$

Finalmente, se generó un gráfico de radar, de acuerdo con todas las permutaciones de biomarcadores utilizando el valor estandarizado:

$$IBR = \sum A_i, \text{ donde } A_i = S_i * S_{i+1} * \frac{\sin\left(\frac{2\pi}{k}\right)}{2} \quad (11)$$

Donde el valor de IBR es el área total del gráfico (A), S_i y S_{i+1} son los valores estandarizados de dos biomarcadores sucesivos para una categoría y k es igual al número de biomarcadores utilizado.

Un valor mayor del IBR indica que esas variables tuvieron un efecto mayor en la respuesta de la población objetivo (Devin et al. 2014), en este caso, las células de músculo esquelético en cultivo. El IBR fue estimado a través de la interfaz CALculate IBR (CALIBRI, <https://liec-univ-lorraine.shinyapps.io/calibri/>) propuesta por el Laboratorio de Ambientes Continentales (LIEC) de la Universidad de Lorena, Francia (Beliaeff y Burgeot 2002). Se utilizó la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para evaluar las diferencias en los valores del IBR entre tratamientos (condiciones control y exposición a DEHP) para cada especie (Daniel y Cross 2014).

6.6.5 Diferencias entre especies

Se utilizó la prueba *Mann-Whitney-Wilcoxon* (Daniel y Cross 2014) para detectar diferencias entre especies, para cada condición de cultivo (control y exposición a DEHP), en términos de indicadores de estrés oxidativo, incluyendo actividad enzimática, producción de radical $O_2^{\bullet-}$, niveles de marcadores de daño oxidativo (TBARS y carbonilos proteicos) y expresión génica.

Se realizó un análisis discriminante lineal (ADL) por condición de cultivo (control y DEHP) para identificar las variables que mejor describen las diferencias entre especies (humano y lobo marino de California). Para ello se consideró como variable dependiente a la especie y como variables independientes a la producción de radical $O_2^{\bullet-}$, niveles de marcadores de daño oxidativo (TBARS y carbonilos proteicos) y la actividad enzimática de SOD, CAT, GR, GPx y GST. Al no cumplirse los supuestos estadísticos, se asumieron normalidad y homogeneidad de varianzas para este análisis (Li et al. 2006).

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la dosis a utilizar en los bioensayos de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

De los análisis para establecer la concentración de DEHP a utilizar en los bioensayos de exposición de las células de músculo esquelético en condiciones de cultivo primario se obtuvo que, a partir de 1 mM de DEHP (Fig. 7, círculos negros) la viabilidad celular se reduce en un 60% (Fig. 7, línea punteada color naranja). Partiendo de este dato, los bioensayos para ambas especies (humano, lobo marino de California) se realizaron utilizando una concentración de 1 mM de DEHP por 13 días. En la figura 7 se muestra la relación inversa entre la concentración de DEHP en la solución madre, y por tanto del DEHP disuelto (biodisponible) en el medio de cultivo celular, y la viabilidad de células musculares en cultivo primario.

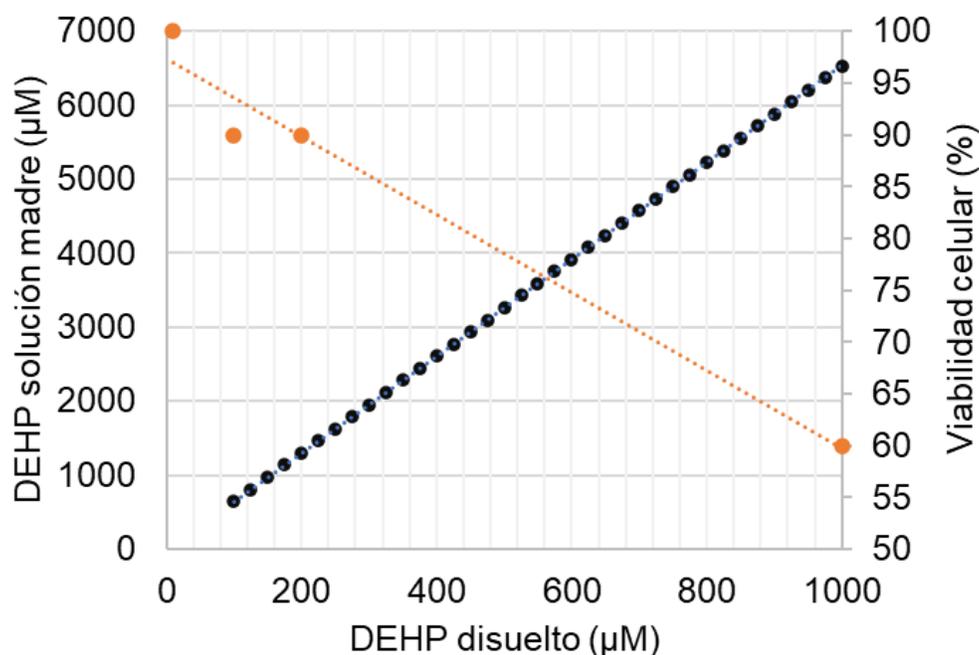


Figura 7. Relación de la concentración teórica de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) disuelto (puntos negros) y la viabilidad celular (línea punteada naranja) utilizadas para establecer la concentración de DEHP a utilizar en los bioensayos de exposición de las células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en condiciones de cultivo primario.

7.2 Tamaño de muestra

El tamaño óptimo de muestra a partir de un poder estadístico de 0.8 fue de 26 muestras por grupo (grupos control y exposición a DEHP). Por lo anterior, el tamaño muestral utilizado en el presente estudio para cada grupo ($n=25$) para ambas especies se acerca al poder estadístico de 80% (Ellis 2010) (Fig. 8).

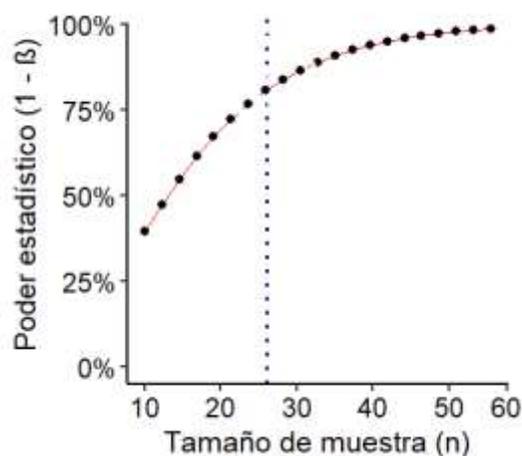


Figura 8. Tamaño muestral óptimo estimado a partir de un poder estadístico de 0.8 (Leongómez 2020), estimado para conocer el número óptimo de cultivos primarios para muestras de humanos (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*).

7.3 Efectos de la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en cultivos primarios de músculo esquelético

7.3.1 Humano

Se establecieron cultivos celulares primarios a partir de biopsias de cinco humanos. En promedio, los bioensayos de exposición a 1 mM DEHP se establecieron a partir del tercer pase. La exposición a 1 mM de DEHP por 13 días redujo un 69% (promedio) la viabilidad de las células musculares en cultivo en comparación con los controles (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=25$, $p=0.011$) (Tabla 7).

Tabla 7. Viabilidad celular de los cultivos primarios de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) durante 13 días de exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM).

Sujeto	Condiciones	Células mL ⁻¹ ± desv. std.	Viabilidad celular (%)	n
1	Control	892,917 ± 174,384	92	5
	DEHP	532,083 ± 65,555	38	5
2	Control	1,067,778 ± 174,644	95	5
	DEHP	826,677 ± 268,049	77	5
3	Control	2,711,723 ± 601,382	97	5
	DEHP	929,012 ± 220,965	83	5
4	Control	549,938 ± 438,697	96	5
	DEHP	833,333 ± 90,010	77	5
5	Control	448,131 ± 328,475	97	5
	DEHP	978,395 ± 222,992	68	5

Abreviaturas: (desv. std.) desviación estándar.

En la figura 9 se presentan fotografías representativas de los cambios morfológicos observados en el cultivo primario de células de músculo esquelético de humano expuestas a DEHP (1 mM) durante 13 días. A partir del tercer día del bioensayo se observaron micelas, presumiblemente de ftalato, dentro del citosol. La membrana de las células satélite se contrajo, perdiendo volumen y su forma esférica típica. Estos cambios fueron más notorios en células que no se encontraban agrupadas, es decir, con espacios entre células adyacentes, mismas que mostraban una superficie granulosa. A partir del sexto día del bioensayo, las micelas de ftalato se observaron al interior del núcleo, las membranas nucleares aparecen disociadas o difusas, evidenciando alteraciones en la morfología del núcleo. Algunas células satélite, y musculares en general, perdieron adherencia y se encontraron flotando en el medio. Con el tiempo de bioensayo aumentó el número de células con apariencia plasmolizada, observándose la presencia de cuerpos o gránulos de estrés en el citosol, principalmente, alrededor del núcleo. En el noveno día de bioensayo, se observó que las células musculares perdieron turgencia y, por tanto, volumen; el espacio entre células fue más evidente y algunas células en plasmólisis se encontraron flotando en el medio de cultivo. Al finalizar el bioensayo (día 13), la presencia de células satélite fue menos evidente en los cultivos expuestos a DEHP en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control. En algunas células plasmolizadas se observó un cambio de coloración a amarillo; este color también fue observado en las células desprendidas flotantes. No se observaron cambios en la morfología o función celular durante todo el período

de incubación (13 días) en las células que se mantuvieron bajo condiciones control (sin DEHP), observándose células satélite, división celular, ~3 capas de células musculares y células multinucleadas alargadas (Fig. 9).

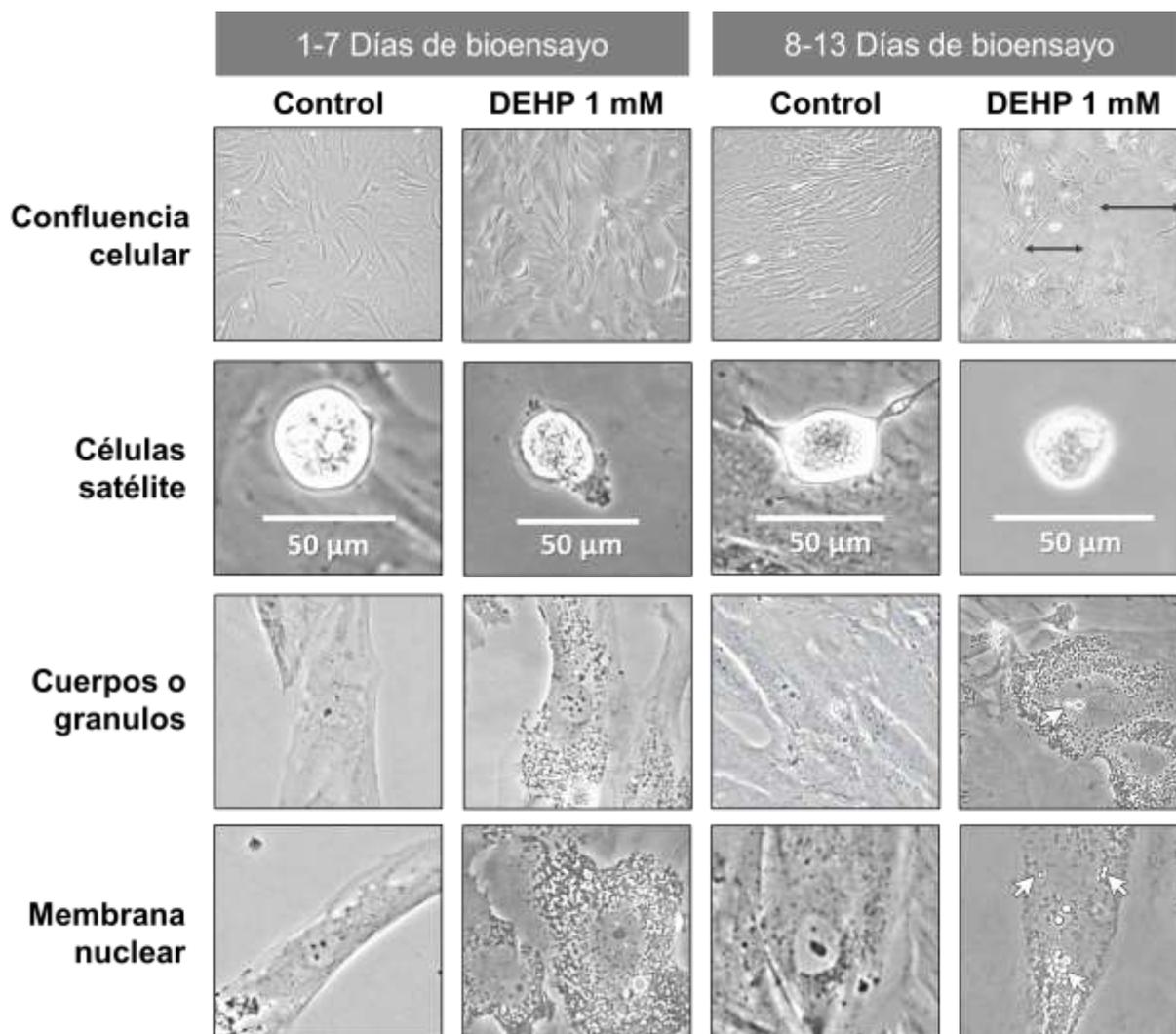


Figura 9. Cambios morfológicos en cultivos primarios de células de músculo esquelético de humano expuestas por 13 días a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Todas las imágenes fueron tomadas a 20X y ampliadas para su apreciación. Las flechas negras (\leftrightarrow) indican los espacios entre grupos de células; las flechas blancas (\rightarrow) indican micelas o partículas, presumiblemente, de ftalato.

Se tomaron 526 fotografías correspondientes a los bioensayos con células musculares de humano mantenidas bajo condiciones control ($n=25$) y expuestas a DEHP ($n=25$) para evaluar cambios celulares estructurales, estimar la proliferación y la frecuencia de células satélite. De

éstas, 413 (78.5%) imágenes, 214 correspondientes al control y 199 a las exposiciones a DEHP, cumplieron con los filtros de selección basados en luz, contraste y nitidez.

Al finalizar los 13 días del bioensayo, las alteraciones observadas en las células musculares de humano expuestas a DEHP (1 mM) incluyeron una reducción significativa en el número de células satélite presentes en los cultivos (Fig. 10). Estos resultados fueron observados tanto en la primera como en la segunda semana de bioensayo (Fig. 10).

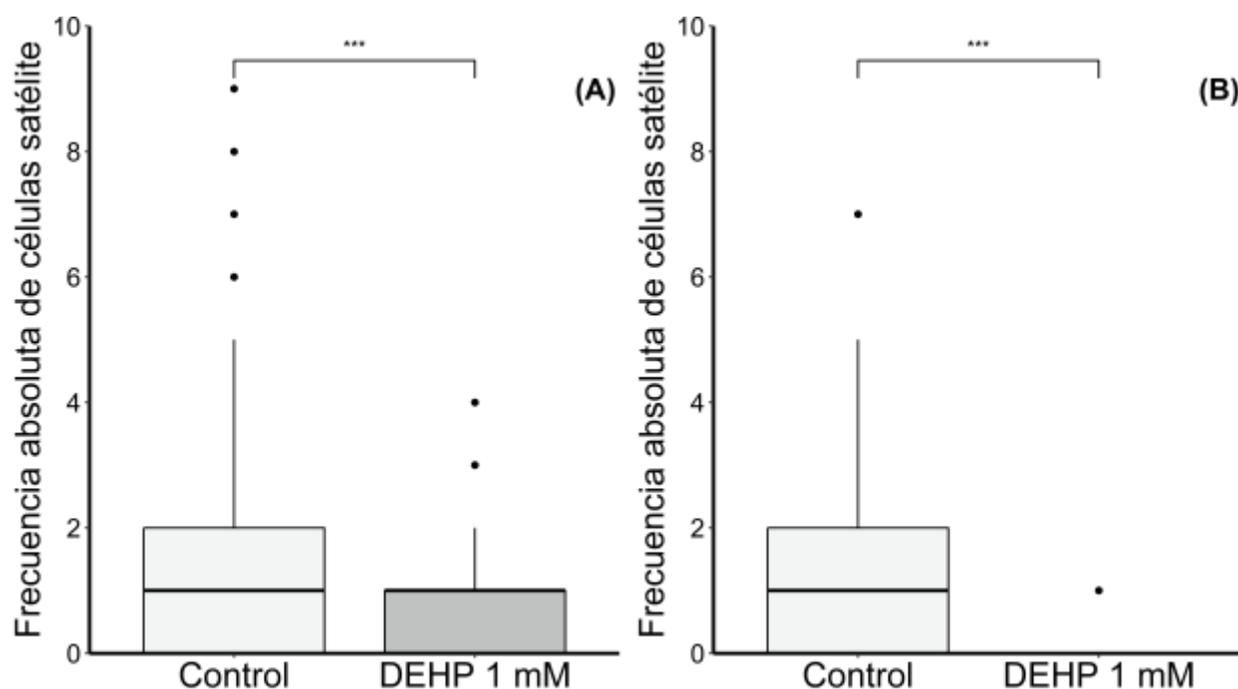


Figura 10. Frecuencia absoluta de las células satélite en cultivos primarios de las células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP 1 mM) durante 13 días. (A) Datos correspondientes a los días 1-7 de bioensayo; (B) datos correspondientes a los días 8-13 de bioensayo; (***) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos color gris y negro en el gráfico representan datos atípicos y extremos, respectivamente.

Los modelos GLMM generados por condición de cultivo (control y DEHP) se presentan a continuación:

$$\text{Control } \hat{y}_i = 223,488.6 + 33,236.7x_i \quad (12)$$

$$\text{DEHP } \hat{y}_i = 203,660.3 + 17,866.9x_i \quad (13)$$

Donde \hat{y}_i es el promedio estimado del número de células y x_i es el tiempo de exposición.

En general, los GLMM obtenidos para células de músculo esquelético de humano fueron significativos al compararlos con un modelo nulo (χ^2 bondad de ajuste, $p < 0.01$). La variable tiempo de exposición (x) fue significativa tanto en el GLMM obtenido para células de músculo esquelético de humano mantenidas bajo condiciones control (t de Student = 121.5, $p < 0.001$), como en el GLMM correspondiente a los resultados de las células expuestas a DEHP (t de Student = 94.18, $p < 0.001$) (Tabla 8). Por lo tanto, en ambos modelos el tiempo de exposición contribuye a predecir la tasa de proliferación celular, independientemente del tratamiento (control o exposición a DEHP). Los residuales del modelo control (*Shapiro-Wilk* = 0.92, $p = 0.055$) y exposición (*Shapiro-Wilk* = 0.95, $p = 0.29$) fueron normales, por lo que se asume que se cumplieron los supuestos en ambos modelos.

Tabla 8. Resumen de los efectos del tiempo de exposición en la capacidad proliferativa de cultivos primarios de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) bajo condiciones control y en respuesta a la exposición con di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) por 13 días.

Condiciones	Variable	Estimado	ES	t	p	AICc	AIC
Control	Intercepto	223,488.6	231.1	967.0	< 0.001	618.6	615.5
	Tiempo	33,236.7	273.1	121.5	< 0.001		
DEHP	Intercepto	203,660.3	259.8	783.91	< 0.001	605.5	602.3
	Tiempo	17,866.9	519.6	34.39	< 0.001		

ES, error estándar; t, prueba paramétrica t de Student; p, nivel de significancia; AIC, criterio de información de Akaike; AICc, criterio de información de Akaike corregido.

Los resultados obtenidos a partir de los GLMM indican que, en el grupo control la abundancia total de células que podría esperarse a la mitad del bioensayo (6.5 días) fue de 223,489 células en 25 cm² (± 273 error estándar) más ~200,000 correspondientes a la totalidad de células al iniciar el bioensayo. Con base en el GLMM construido con los datos de las células de músculo esquelético de humanos expuestas a DEHP, la abundancia total de células que podría esperarse a la mitad del bioensayo (6.5 días) fue de 203,660 células en 25 cm² (± 519 error estándar) más ~200,000 correspondientes a la totalidad de células al iniciar el bioensayo (Tabla 8).

Para las células mantenidas bajo condiciones control, el aumento diario en la abundancia celular fue de 33,237 células, siendo mayor al aumento observado en los cultivos expuestos a DEHP (17,867 células) (Tabla 8, ecuaciones 12 y 13). Por lo anterior, las células de músculo esquelético de humano proliferan a una menor tasa cuando se encuentran expuestas a 1 mM de DEHP.

Ambos GLMM mostraron pendientes positivas, por lo que la proliferación celular se mantuvo en ambas condiciones de cultivo; sin embargo, la abundancia celular fue significativamente menor en los cultivos expuestos a DEHP que en los cultivos bajo condiciones control (t de Student = -48.28, $p < 0.001$). El tiempo de cultivo contribuyó a explicar el 91% ($p < 0.001$) y 90% ($p < 0.001$) de la devianza del número total de células de músculo esquelético bajo condiciones control y expuestas a DEHP, respectivamente (Fig. 11). La tasa de cambio en el número de las células de músculo esquelético fue menor (pendiente) y significativamente distinta (t de Student = 2.44, $p < 0.001$) en aquellos cultivos que fueron expuestos durante 13 días a DEHP en comparación con los controles, en cada humano.

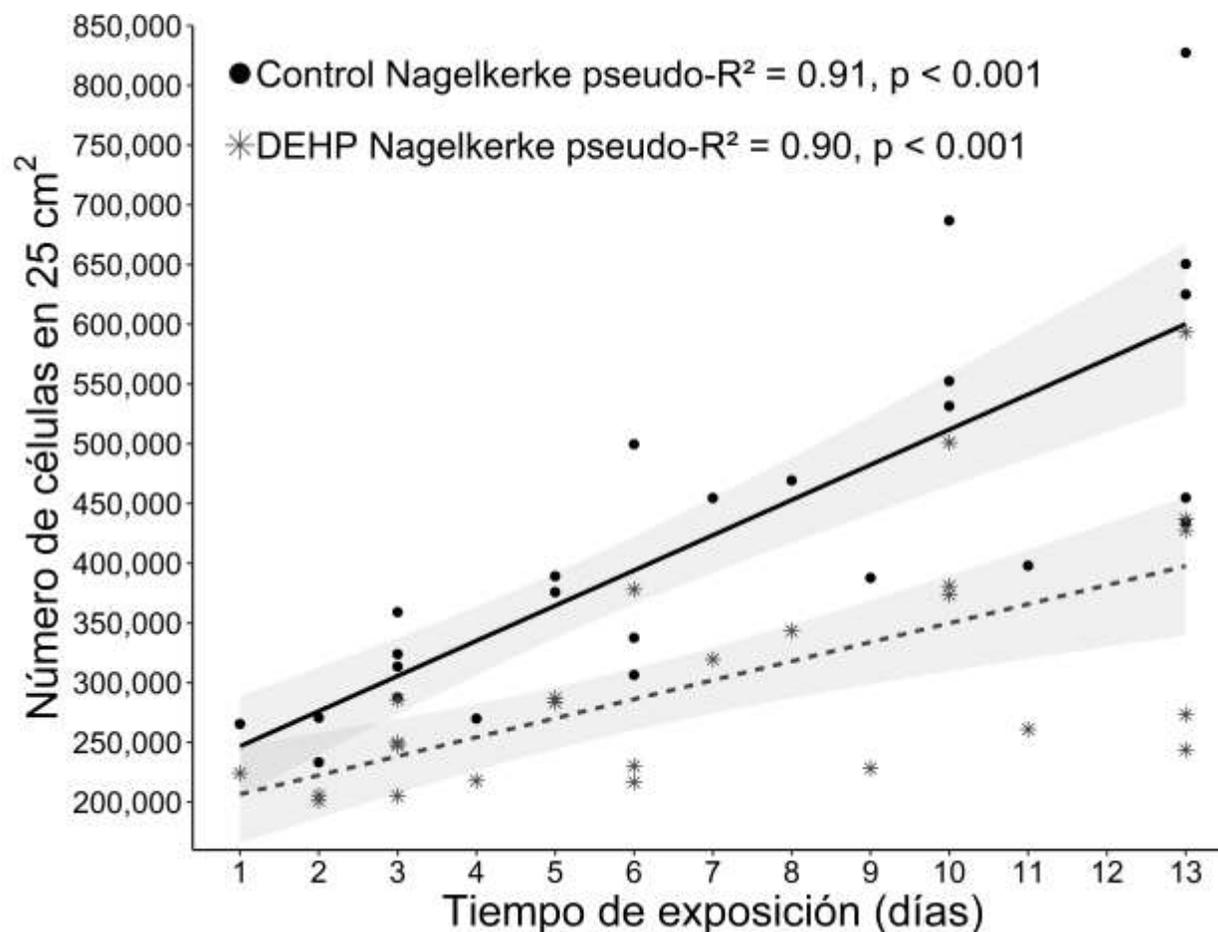


Figura 11. Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) y Nagelkerke pseudo R² representando el número total de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) estimadas en 25 cm² bajo condiciones de cultivo primario luego de 13 días de bioensayo bajo condiciones control (—) (●) y expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (---) (*). Las líneas representan los modelos lineales de regresión estimados, los cuales describen la asociación entre el número total de células y el tiempo de cultivo en células y sus correspondientes controles. Los puntos en el gráfico corresponden a los valores estimados por los modelos control y exposición a DEHP 1 mM junto a su error estándar (sombra gris).

7.3.2 Lobo marino de California

Se establecieron cultivos celulares primarios a partir de biopsias de un lobo marino de California (*Z. californianus*). En promedio, los bioensayos de exposición a 1 mM DEHP se establecieron a partir del tercer pase. La exposición a 1 mM de DEHP redujo un 79% (promedio) la viabilidad celular (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=24$, $p<0.05$) de los cultivos expuestos en comparación con los controles. La viabilidad celular estimada al término de los 13 días de bioensayos se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Viabilidad celular de cultivos primarios de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) durante 13 días de bioensayo.

Sujeto	Condiciones	Células mL ⁻¹ ± desv. std.	Viabilidad celular (%)	n
1	Control	1,183,911 ± 1,152,161	96	5
	DEHP	464,286 ± 99,787	89	5
2	Control	416,250 ± 3,750	81	5
	DEHP	262,500 ± 32,404	75	5
1	Control	1,032,500 ± 39,370	92	5
	DEHP	183,750 ± 3,750	79	5
1	Control	745,000 ± 43,445	93	5
	DEHP	527,500 ± 30,208	79	5
1	Control	423,750 ± 11,250	90	5
	DEHP	116,250 ± 3,750	75	5

desv. std., desviación estándar

En la figura 12 se presentan fotografías representativas de los cambios morfológicos observados en el cultivo primario de células de músculo esquelético de lobo marino de California expuestas a DEHP (1 mM) durante 13 días. Luego de 24 horas, se observan gránulos en la superficie de las células tratadas con DEHP. A partir del tercer día del bioensayo, algunas células satélite, y musculares en general, perdieron adherencia y se encontraron flotando en el medio. También se observaron grupos de células con apariencia plasmolizada. Para este día (3) la presencia de cuerpos o gránulos de estrés en el citosol era más evidente, principalmente, alrededor del núcleo. Al sexto día de bioensayo, se observaron micelas, presumiblemente de ftalato, al interior de la célula y núcleo. Asimismo, se encontraron pocas células satélite plasmolizadas flotando, es decir, se observaron con menor volumen y perdiendo su forma esférica típica. Algunas células musculares mostraban malformaciones y proyecciones. Se observaron cambios en la morfología del núcleo, incluyendo pérdida de la integridad de las membranas nucleares. En el décimo día de bioensayo, se observó que las células musculares perdieron turgencia y, por tanto, volumen; el espacio entre células fue más evidente y algunas células en plasmólisis se encontraron flotando en el medio de cultivo. Al finalizar el bioensayo (día 13), la presencia de células satélite fue más evidente, en términos de abundancia, en los cultivos expuestos a 1 mM DEHP. Las células musculares se observaban de menor tamaño en los cultivos expuestos al ftalato. Algunas células plasmolizadas mostraron un cambio de coloración a amarillo, este color también fue observado en las células desprendidas flotantes. En cuanto a las células que se

mantuvieron bajo condiciones control (sin DEHP), no se observaron cambios en la morfología o función celular durante todo el período de incubación (13 días), observándose células satélite, división celular, ~2 capas de células musculares y algunas células multinucleadas alargadas.

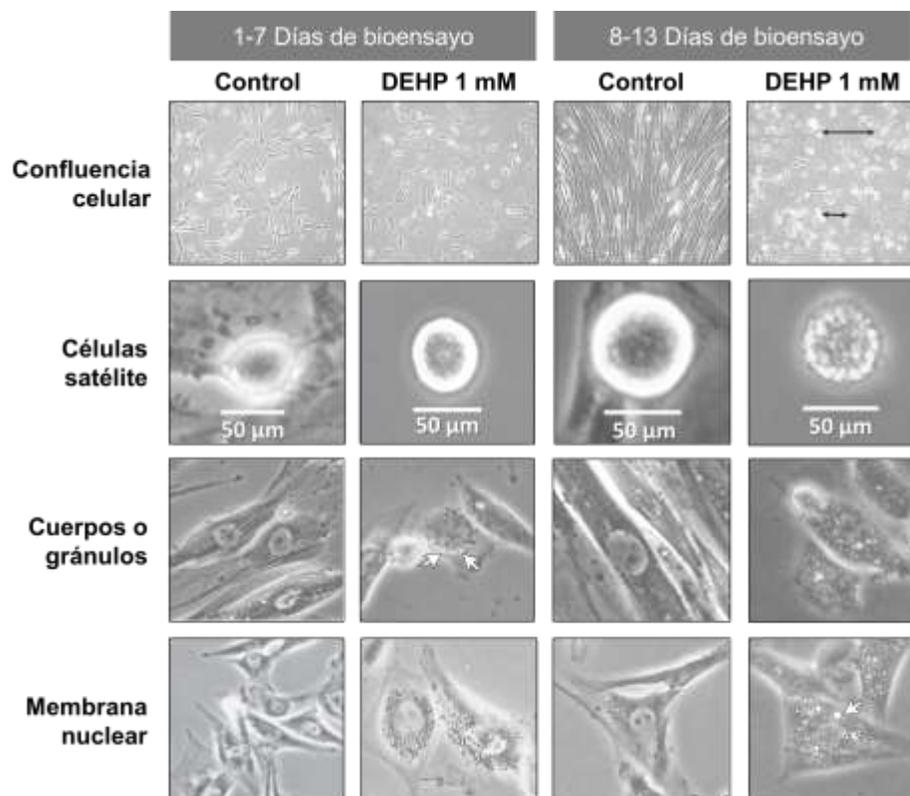


Figura 12. Cambios morfológicos en cultivos primarios de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestas por 13 días a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Todas las imágenes fueron tomadas a 20X y ampliadas para su apreciación. Las flechas negras (\leftrightarrow) indican los espacios entre grupos de células; las flechas blancas (\rightarrow) indican micelas o partículas, presumiblemente, de ftalato.

Se tomaron 991 fotografías correspondientes a los bioensayos con células musculares de lobo marino de California, bajo condiciones control ($n=25$) y expuestas a 1 mM DEHP ($n=25$), para evaluar cambios celulares estructurales, estimar la proliferación y la frecuencia de células satélite. Del total, 475 imágenes correspondieron a las células musculares en cultivo primario bajo condiciones control y 516 a aquellas tratadas con DEHP. El 100% de las fotografías cumplieron con los filtros de selección basados en luz, contraste y nitidez.

Las alteraciones observadas en las células musculares de lobo marino de California expuestas a DEHP incluyen un aumento significativo en el número de células satélite presentes en los cultivos. La capacidad regenerativa de las células musculares, medida en términos de frecuencia absoluta de las células satélite, se mantuvo durante los 13 días de bioensayo (Fig. 13).

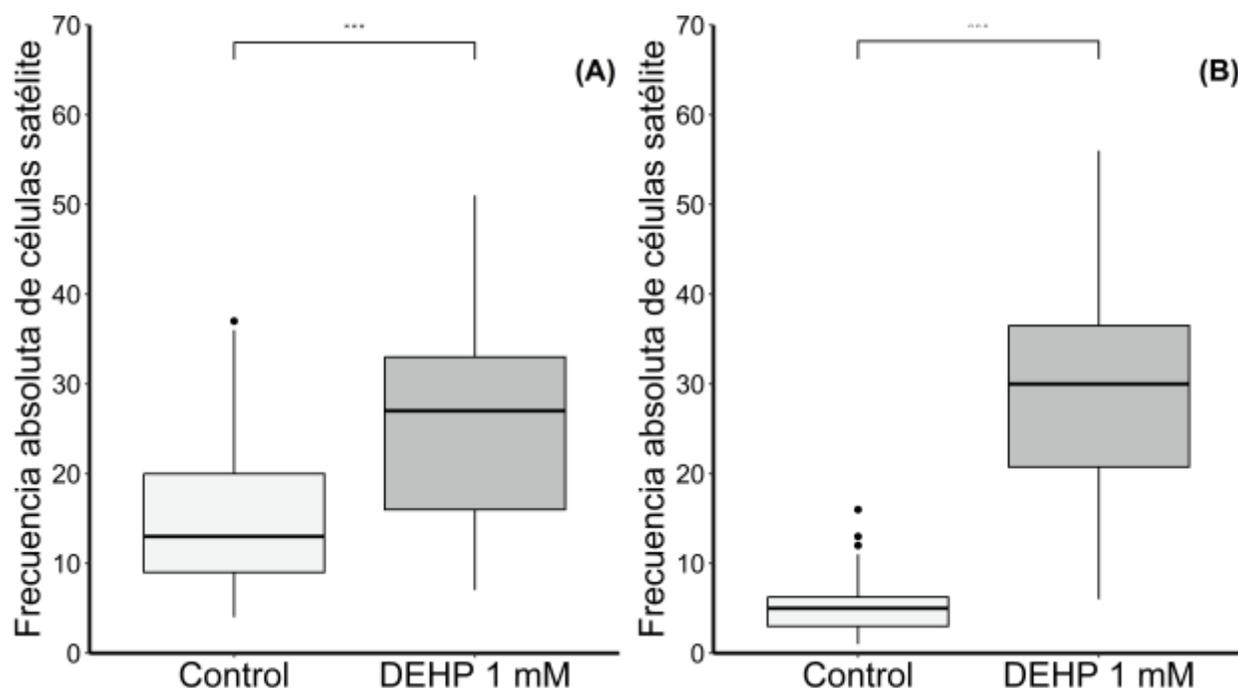


Figura 13. Frecuencia absoluta de las células satélite presentes en los cultivos primarios de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP 1 mM) durante 13 días. (A) Datos correspondientes a los días 1-7 de bioensayo; (B) datos correspondientes a los días 8-13 de bioensayo; (***) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos color negro en el gráfico representan datos extremos.

Los coeficientes estimados de los GLMM se presentan a continuación:

$$\text{Control } \hat{y}_i = 369,397.4 + 81,657.1x_i \quad (14)$$

$$\text{DEHP } \hat{y}_i = 344,030.2 - 69,845.5x_i \quad (15)$$

Donde \hat{y}_i es el promedio estimado del número de células y x_i es el tiempo de exposición.

En general, los GLMM obtenidos para lobo marino de California fueron significativos al compararlos con un modelo nulo (χ^2 bondad de ajuste, $p < 0.01$). La variable tiempo de exposición (x) fue significativa tanto en el GLMM control (t de Student = 32187929, $p < 0.001$),

como el GLMM correspondiente a la exposición con DEHP (t de Student= 297.4, $p < 0.001$). Estos resultados sugieren que, para ambos modelos, el tiempo de exposición contribuye a predecir la tasa de proliferación celular, independientemente del tratamiento (cultivo bajo condiciones control o exposición a DEHP). Los residuales del modelo control ($Shapiro-Wilk=0.94$, $p=0.17$) y exposición a DEHP ($Shapiro-Wilk=0.96$, $p=0.49$) fueron normales, por lo que se asume que se cumplieron los supuestos en ambos modelos (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de los efectos del tiempo de exposición en la capacidad proliferativa de cultivos primarios de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) bajo condiciones control y exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) por 13 días.

Condición	Variable	Estimado	ES	t	p	AICc	AIC
Control	Intercepto	369,937.4	0.0114	32,187,929	< 0.001	684.9	681.8
	Tiempo	81,657.1	0.0109	7,489,233	< 0.001		
DEHP	Intercepto	344,030.2	200.1	1,719.6	< 0.001	680.1	
	Tiempo	69,845.5	234.9	297.4	< 0.001		

Efecto aleatorio de cada muestra de lobo marino de California independiente; ES, error estándar; t, prueba paramétrica t de Student; p, nivel de significancia; AIC, criterio de información de Akaike; AICc, criterio de información de Akaike corregido.

Los resultados obtenidos a partir de los GLMM indican que en las células de músculo esquelético de lobo marino de California mantenidas bajo condiciones control la abundancia total de células que podría esperarse a la mitad del bioensayo (6.5 días) fue de 369,937 células en 25 cm² (± 0.01 error estándar) más ~200,000 correspondientes a la totalidad de células al iniciar el bioensayo. En cuanto al GLMM de los cultivos expuestos a 1 mM de DEHP, la abundancia total de células que podría esperarse a la mitad del bioensayo (6.5 días) fue de 344,030 células en 25 cm² (± 200 error estándar) más ~200,000 correspondientes a la totalidad de células al iniciar el bioensayo (Tabla 10).

Para las células de músculo esquelético de lobo marino de California mantenidas bajo condiciones control, el cambio en la abundancia celular fue de 81,657 células por día, siendo mayor al observado en los cultivos expuestos a DEHP (69,845 células por día) (Tabla 10, ecuaciones 12 y 13). Por lo anterior, las células de músculo esquelético de lobo marino de California proliferan a una menor tasa cuando se encuentran expuestas a una concentración de 1 mM de DEHP. Ambos GLMM mostraron pendientes positivas, por lo que la proliferación

celular se mantuvo en ambas condiciones de cultivo, con abundancias similares (t de Student=0.964, $p<0.34$) en los cultivos expuestos a DEHP. El tiempo de cultivo contribuyó a explicar el 81% ($p<0.001$) y 76% ($p<0.001$) de la devianza del número total de células de músculo esquelético bajo condiciones control y exposición a DEHP, respectivamente (Fig. 14). La tasa de cambio en el número de las células de músculo esquelético fue menor (pendiente) y significativamente distinta (t de Student= -1083309, $p<0.001$) en aquellos cultivos que fueron expuestos durante 13 días a DEHP en comparación con los controles, en cada lobo marino de California.

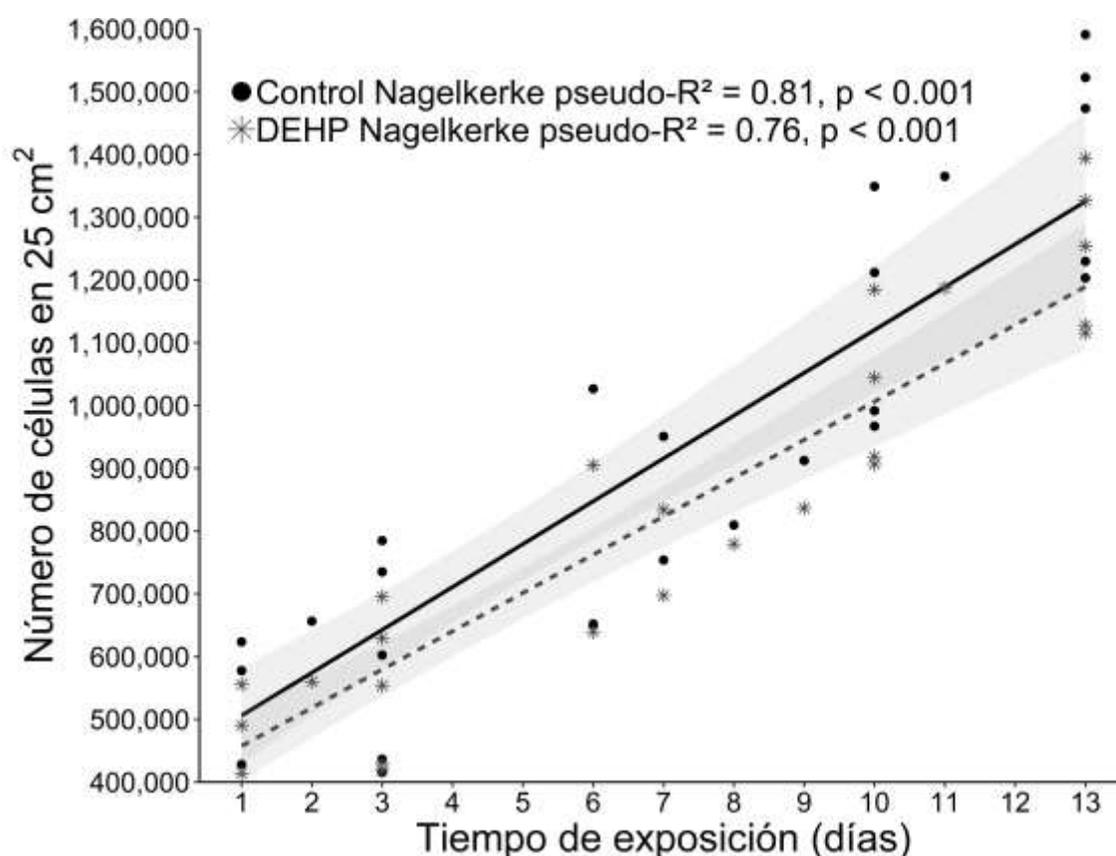


Figura 14. Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) y Nagelkerke pseudo R2 representando el número total de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) estimadas en 25 cm² bajo condiciones de cultivo primario luego de 13 días de bioensayo en condiciones control (—) (●) y en células expuestas a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (---) (*). Las líneas representan los modelos lineales de regresión estimados, los cuales describen la asociación entre el número total de células y el tiempo de cultivo y sus correspondientes controles. Los puntos en el gráfico corresponden a los valores estimados por los modelos control y exposición junto a su error estándar (sombra gris).

7.4 Producción de radical superóxido y marcadores de daño oxidativo

7.4.1 Humano

En la figura 15 se resumen los resultados de la producción de $O_2^{\bullet-}$, la concentración de TBARS y de carbonilos proteicos en células de músculo esquelético de humano en cultivo primario bajo condiciones control y después de la exposición a 1 mM de DEHP por 13 días. La producción de $O_2^{\bullet-}$ fue mayor en las células expuestas a DEHP que en aquellas mantenidas bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=67$, $p=0.01$). La concentración de TBARS no fue significativamente diferente en las células musculares de humanos entre tratamientos (condiciones control y exposición a DEHP) (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=121$, $p=0.27$). La concentración de carbonilos proteicos fue mayor en las células de músculo esquelético de humano en cultivo primario expuestas a 1 mM de DEHP que en aquellas mantenidas bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=29$, $p<0.001$).

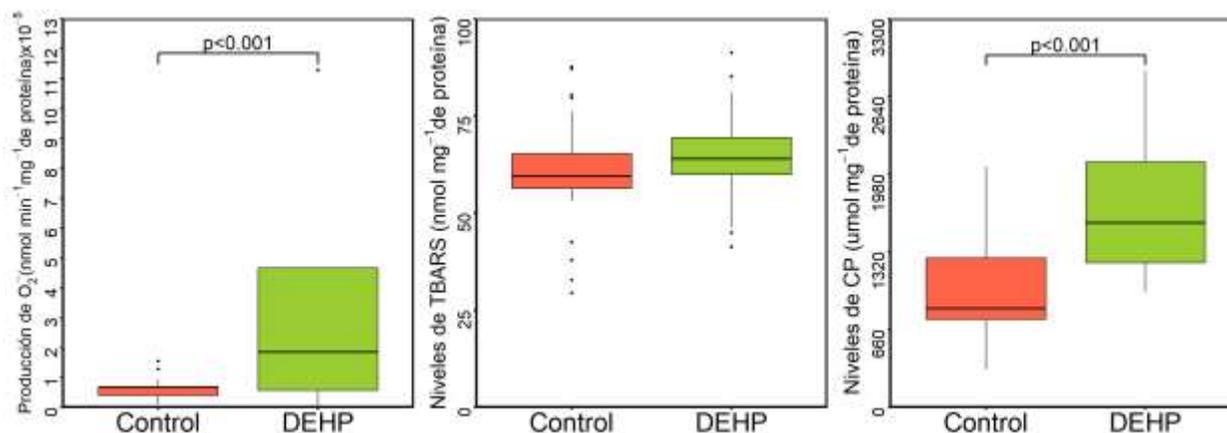


Figura 15. Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, nanomoles por miligramo de proteína por minuto) y marcadores de daño oxidativo a lípidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS, nanomoles por miligramo de proteína) y a proteínas (carbonilos proteicos, CP, micromoles por miligramo de proteína) en cultivos primarios de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), mostradas en el gráfico, corresponden a la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos negros en el gráfico representan datos atípicos.

7.4.2 Lobo marino de California

En la figura 16 se resumen los resultados de la producción de $O_2^{\bullet-}$, la concentración de TBARS y de carbonilos proteicos en células de músculo esquelético de lobo marino de California en

cultivo primario bajo condiciones control y después de la exposición a 1 mM de DEHP por 13 días. La producción de $O_2^{\bullet-}$ fue mayor en las células expuestas a DEHP que en aquellas mantenidas bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=2$, $p<0.001$). La concentración de TBARS y los niveles de carbonilos proteicos no fueron significativamente diferentes en las células musculares de lobo marino de California entre tratamientos (condiciones control y exposición a DEHP) (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=92$, $p=0.058$; *Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=114$, $p=0.23$, respectivamente).

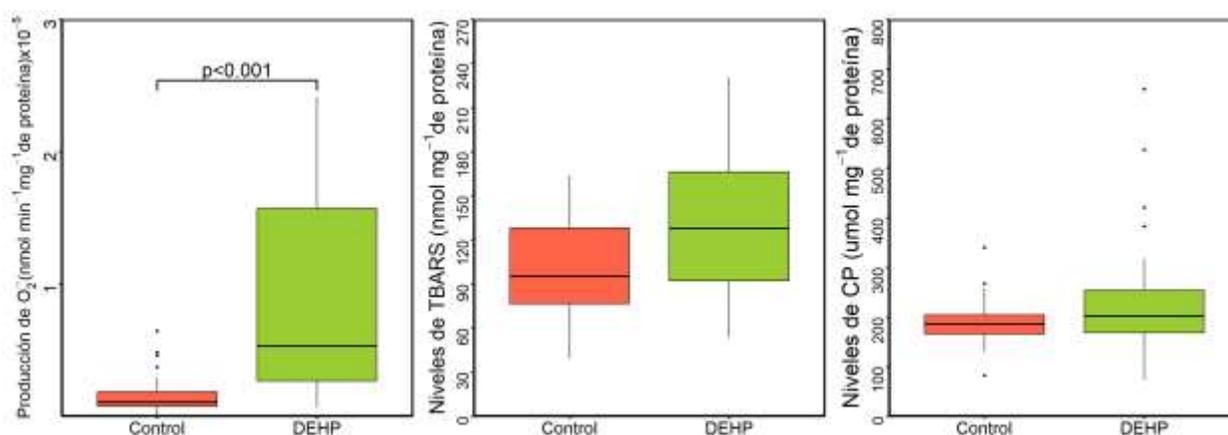


Figura 16. Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, nanomoles por miligramo de proteína por minuto) y marcadores de daño oxidativo a lípidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS, nanomoles por miligramo de proteína) y a proteínas (carbonilos proteicos, CP, micromoles por miligramo de proteína) en cultivos primarios de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$), mostradas en el gráfico, corresponden a la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los puntos negros en el gráfico representan datos atípicos.

7.5 Actividad de las enzimas antioxidantes

7.5.1 Humano

En la Tabla 11 se muestran los estadísticos descriptivos relativos a los resultados de la actividad de las enzimas antioxidantes para las células de músculo esquelético de humanos en cultivo primario expuestas a condiciones control y a 1 mM de DEHP por 13 días.

Tabla 11. Actividad de las enzimas antioxidantes de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) bajo cultivo primario en condiciones control (n=25) y tras la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (n=25) por 13 días. La actividad catalítica de cada enzima se expresa en unidades por miligramo de proteína. En el análisis estadístico de los resultados no se incluyeron valores extremos.

Enzima	Condición	Mediana	Desv. std.	Mín.	Máx.	n
SOD	Control	989.8	506.97	151.7	2301.3	25
	DEHP	1695	585.78	423	3144	25
GPx	Control	55.87	37.39	14.66	145.53	25
	DEHP	52.91	22.17	20.89	121.14	25
GST	Control	41.75	35.59	1.14	146.6	25
	DEHP	51.65	150.49	0.40	496.77	25
GR	Control	113.13	288.2	9.46	916.6	25
	DEHP	101.88	53.25	2.49	171.54	25
CAT	Control	18.35	20.37	3.35	71.61	25
	DEHP	14.51	7.35	4.14	33	25

Desv. std., desviación estándar; Mín., mínimo; Máx., máximo; SOD, Superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S-transferasa; GR, glutatión-disulfuro reductasa; CAT, catalasa; DEHP, di (2-etilhexil) ftalato.

La actividad de las enzimas SOD y GST en células de músculo esquelético de humano expuestas a 1 mM de DEHP por 13 días incrementó significativamente en comparación con los controles ($p < 0.05$) (Fig. 17). No hubo cambios significativos en la actividad de las enzimas CAT, GR y GPx luego de 13 días de exposición a DEHP ($p > 0.05$).

Tabla 12. Actividad de las enzimas antioxidantes de células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) bajo cultivo primario en condiciones control (n=25) y tras la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM) (n=25) por 13 días. La actividad catalítica de cada enzima se expresa en unidades por miligramo de proteína. En el análisis estadístico de los resultados no se incluyeron valores extremos.

Enzima	Condición	Mediana	Desv. std.	Mín.	Máx.	n
SOD	Control	2486	857.14	1003	3700	25
	DEHP	3325	1153.61	1394	5780	25
GPx	Control	18.40	15.27	1.93	55.13	25
	DEHP	34.95	16.00	7.74	85.35	25
GST	Control	87.18	71.97	3.70	246.36	25
	DEHP	137.32	100.06	5.54	379.70	25
GR	Control	81.40	49.93	3.62	221.40	25
	DEHP	45.58	64.67	1.46	212.57	25
CAT	Control	12.88	5.69	4.76	24.47	25
	DEHP	42.69	30.71	3.08	129.78	25

Desv. std., desviación estándar; Mín., mínimo; Máx., máximo; SOD, Superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S-transferasa; GR, glutatión-disulfuro reductasa; CAT, catalasa; DEHP, di (2-etilhexil) ftalato.

La actividad de las enzimas SOD, GPx y CAT en las células de músculo esquelético de lobo marino de California en cultivo primario expuestas a 1 mM de DEHP por 13 días fue significativamente mayor en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control ($p < 0.05$) (Fig. 18). La actividad de las enzimas GR y GST en las células de músculo esquelético de lobo marino de California en cultivo primario después de 13 días de exposición a DEHP no fue significativamente distinta a aquella en las células bajo condiciones control ($p > 0.05$).

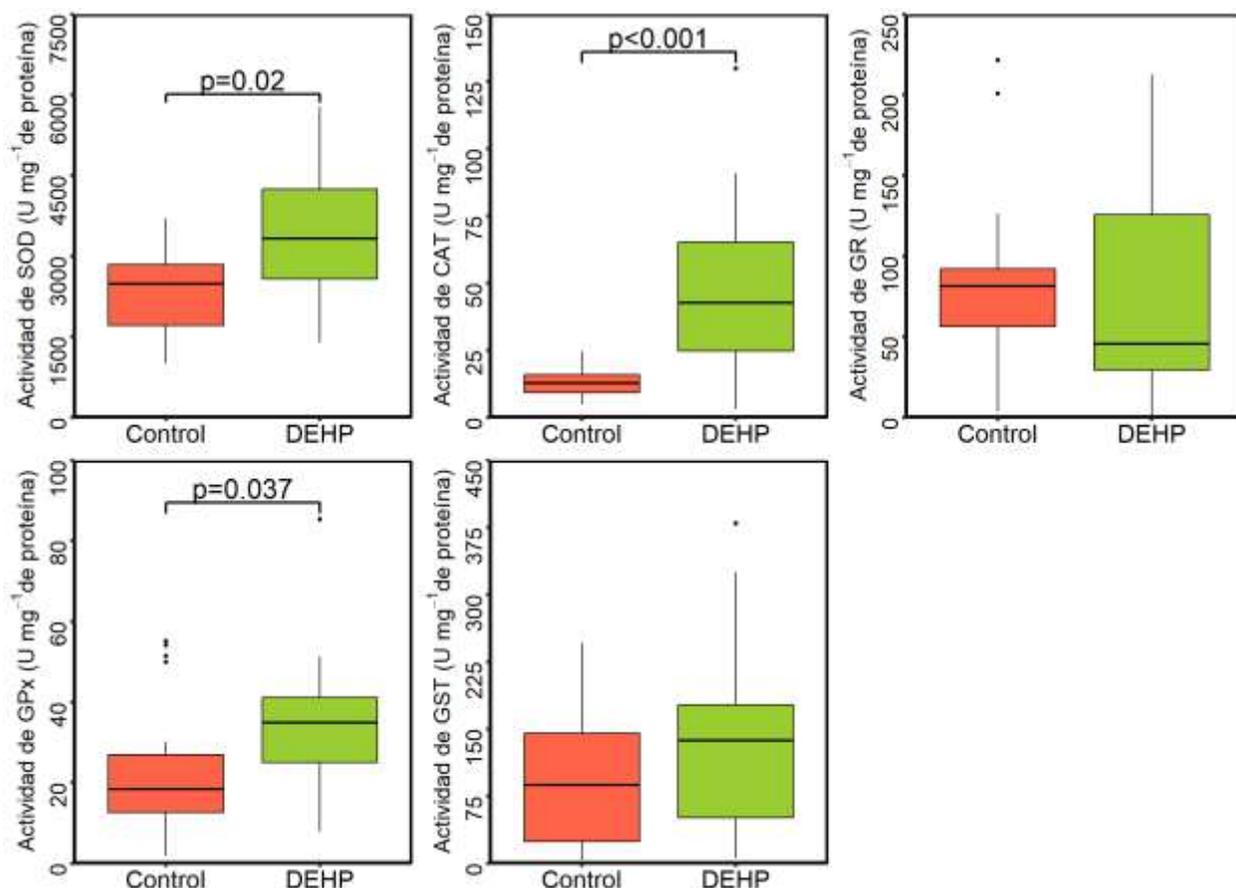


Figura 18. Actividad de las enzimas antioxidantes en cultivos primarios de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y exposición a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP). (SOD) Superóxido dismutasa; (GPx) glutatión peroxidasa; (GST) glutatión S-transferasa; (GR) glutatión-disulfuro reductasa; (CAT) catalasa. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) corresponden a la prueba de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. Los puntos negros en el gráfico representan datos atípicos.

7.6 Expresión génica de antioxidantes, marcadores de reparación del daño oxidativo, respuesta inflamatoria y muerte programada en células de músculo esquelético en cultivo primario en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

7.6.1 Humano

En las células de músculo esquelético de humanos mantenidas bajo cultivo primario en condiciones control y tratadas con 1 mM DEHP por 13 días ($n=25$ control, $n=25$ DEHP) se encontró material genético íntegro apropiado para análisis de expresión génica. A partir de los productos de extracción, se pudo confirmar la presencia de ARN correspondiente a los transcritos de los 28 genes de interés. *ACTB* fue identificado como el gen endógeno más estable

en los cultivos, tanto en las células musculares mantenidas bajo condiciones control como en aquellas expuestas a DEHP. Por lo tanto, se utilizó *ACTB* como gen de referencia para normalizar los datos obtenidos en el presente estudio.

La figura 19 presenta los cambios (magnitud, dirección, significancia estadística) observados en la expresión génica de antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa; y PRDX, peroxirredoxina); factores de transcripción (PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; y NRF2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), marcador de reparación del daño oxidativo (OGG, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa), citocinas inflamatorias (IL, interleucinas) e indicadores de muerte celular programada (CASP, caspasa) en células de músculo esquelético de humanos en respuesta a la exposición a DEHP (1 mM por 13 días). En estas células, los niveles de expresión relativa del ARN mensajero (ARNm) de los genes que codifican para las enzimas *SOD2*, *GPx3*, *GPx7*, *GSTK1*, *GSTM1*, *MGST1*, *GSTO1*, *GSTZ1* y *PRDX1* fue mayor ($p < 0.05$), mientras que la expresión de los genes que codifican para *SOD1*, *CAT*, *GR*, *GPx1*, *GPx2*, *GPx4*, *GPx8*, *GSTA4*, *GSTP1* y *GSTT1* fue menor ($p < 0.05$), con respecto al control, después de la exposición a DEHP. La expresión de *SOD3* no fue significativamente diferente en las células expuestas a DEHP con respecto al control ($p > 0.05$). La exposición a DEHP disminuyó la expresión de los transcritos correspondientes a los genes *PPARA*, *PPARD*, *CASP3*, *NRF2* y *OGG1* en las células musculares de humanos en cultivo primario ($p < 0.05$). Los niveles del transcrito para *IL-6* aumentaron significativamente ($p < 0.05$), mientras que aquellos para *IL-16* disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) y aquellos para *IL-15* ($p > 0.05$) no fueron significativamente diferentes en respuesta a la exposición a DEHP en comparación con las células en condiciones control. En la Tabla 13, se muestran los valores de significancia (p) ajustados correspondientes a la prueba FDR.

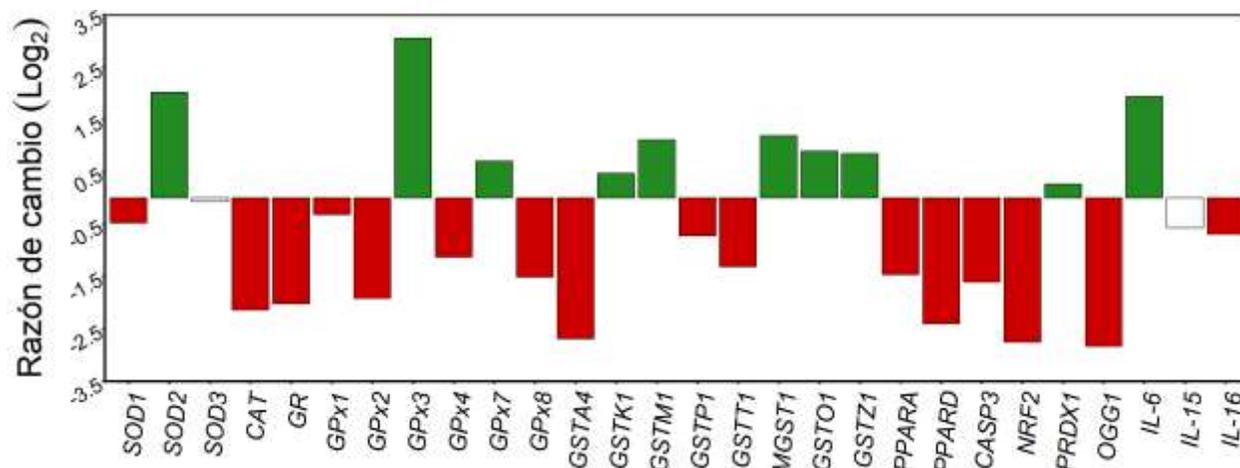


Figura 19. Perfil transcripcional de genes que codifican para enzimas antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa; y PRDX, peroxirredoxina); factores de transcripción (PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; y NRF2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), marcador de reparación del daño oxidativo (OGG, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa), citocinas inflamatorias (IL, interleucinas) e indicadores de muerte celular programada (CASP, caspasa) en células de músculo esquelético de humanos (*Homo sapiens sapiens*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP). Los valores en el eje y se expresan como logaritmo en base 2 de la media de los valores normalizados de expresión (gen de referencia ACTB, actina beta). Las barras de color sólido representan a los genes que fueron significativamente ($p < 0.05$) sobreexpresados (verdes) o subexpresados (rojos) en los cultivos expuestos a DEHP; mientras que las barras blancas indican que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para un gen en particular, con base en la prueba de *Kruskal-Wallis*. La longitud de las barras indica la magnitud de la diferencia en la expresión de un gen de las muestras expuestas a DEHP con respecto al control, estimada como el cociente entre los valores de expresión de los cultivos expuestos a DEHP y los valores de expresión en las muestras control.

Tabla 13. Valores de p-ajustados estimados a partir de la tasa de descubrimiento falso (FDR) para los valores p de la prueba Kruskal-Wallis (KW) realizada sobre las variables de expresión génica de enzimas antioxidantes, marcadores de reparación del daño oxidativo, citocinas inflamatorias e indicadores de muerte programada en células de músculo esquelético de humanos (*Homo sapiens sapiens*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP).

Gen	Valor p (KW)	p-ajustada (FDR) $\alpha=0.05$	p-ajustada (FDR) $\alpha=0.01$
Superóxido dismutasa 1	0.037	0.039	0.039
Superóxido dismutasa 2	0.037	0.039	0.039
Superóxido dismutasa 3	0.487	0.039	0.487
Catalasa	0.037	0.039	0.039
Glutación reductasa	0.037	0.039	0.039
Glutación peroxidasa 1	0.037	0.039	0.039
Glutación peroxidasa 2	0.037	0.039	0.039
Glutación peroxidasa 3	0.037	0.039	0.039
Glutación peroxidasa 4	0.037	0.039	0.039
Glutación peroxidasa 7	0.037	0.039	0.039
Glutación peroxidasa 8	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa alpha 4	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa kappa 1	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa miu 1	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa pi 1	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa theta 1	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa microsomal 1	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa omega 1	0.037	0.039	0.039
Glutación S transferasa zeta 1	0.037	0.039	0.039
PPAR alpha	0.037	0.039	0.039
PPAR delta	0.037	0.039	0.039
Caspasa 3	0.037	0.039	0.039
Factor nuclear eritroide 2	0.037	0.039	0.039
Peroxirredoxina 1	0.037	0.039	0.039
Interleucina 6	0.037	0.039	0.039
Interleucina 15	0.487	0.039	0.487
Interleucina 16	0.037	0.039	0.039
8-Oxoguanina ADN glicosilasa	0.037	0.039	0.039

7.6.2 Lobo marino de California

En las células de músculo esquelético de lobo marino de California mantenidas bajo cultivo primario en condiciones control y tratadas con 1 mM DEHP por 13 días ($n=25$ control, $n=25$

DEHP) se encontró material genético íntegro apropiado para análisis de expresión génica. A partir de los productos de extracción, se pudo confirmar la presencia de ARN correspondiente a los transcritos de 27 genes de interés. Los oligos correspondientes a *IL-16* no fueron funcionales, ya que la PCR cuantitativa no fue capaz de detectar transcritos correspondientes a este gen en las muestras tratadas con DEHP. En el caso de *la IL-15*, se aplicó la técnica de qPCR anidado para reducir la posibilidad de amplificar productos inespecíficos y aumenta la sensibilidad y especificidad de la detección de este gen. *GAPDH* fue identificado como el gen endógeno más estable en los cultivos, tanto en las células musculares mantenidas bajo condiciones control como en aquellas expuestas a DEHP. Por lo tanto, se utilizó *GAPDH* como gen de referencia para normalizar los datos obtenidos en el presente estudio.

La figura 20 presenta los cambios (magnitud, dirección, significancia estadística) observados en la expresión génica de antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa; y PRDX, peroxirredoxina); factores de transcripción (PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; y NRF2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), marcador de reparación del daño oxidativo (OGG, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa), citocinas inflamatorias (IL, interleucinas) e indicadores de muerte celular programada (CASP, caspasa) en células de músculo esquelético de lobo marino de California en respuesta a la exposición a DEHP (1 mM por 13 días). En las células de lobo marino de California expuestas a DEHP los niveles de expresión relativa del ARN mensajero (ARNm) de los genes que codifican para las enzimas *SOD3*, *GPx2* y *GPx8* fue mayor ($p < 0.05$), mientras que la expresión de los genes que codifican para *CAT*, *GR*, *GPx1*, *GPx7*, *GSTA4*, *GSTK1*, *GSTM5*, *GSTT1*, *MGST1*, *GSTZ1* y *PRDX1* fue menor ($p < 0.05$), con respecto al control. La expresión de *GPx3*, *GPx4* y *GSTP1* no fue significativamente diferente en las células expuestas a DEHP con respecto al control ($p > 0.05$). La exposición a La expresión de los transcritos correspondientes a los genes *PPARD* y *PRDX1* fue menor en las células musculares de lobo marino de California expuestas a DEHP ($p < 0.05$); mientras que la expresión de *NRF2* y *OGG1* fue mayor ($p < 0.05$) en comparación con las células mantenidas en condiciones control. La expresión de los genes *CASP3* y *PPARA* no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Los niveles del transcrito para *IL-15* fueron significativamente mayores

($p < 0.05$), mientras que aquellos para *IL-6* fueron significativamente menores ($p < 0.05$) después de la exposición a DEHP en comparación con las células en condiciones control. En la Tabla 14, se muestran los valores de significancia (p) ajustados correspondientes a la prueba FDR.

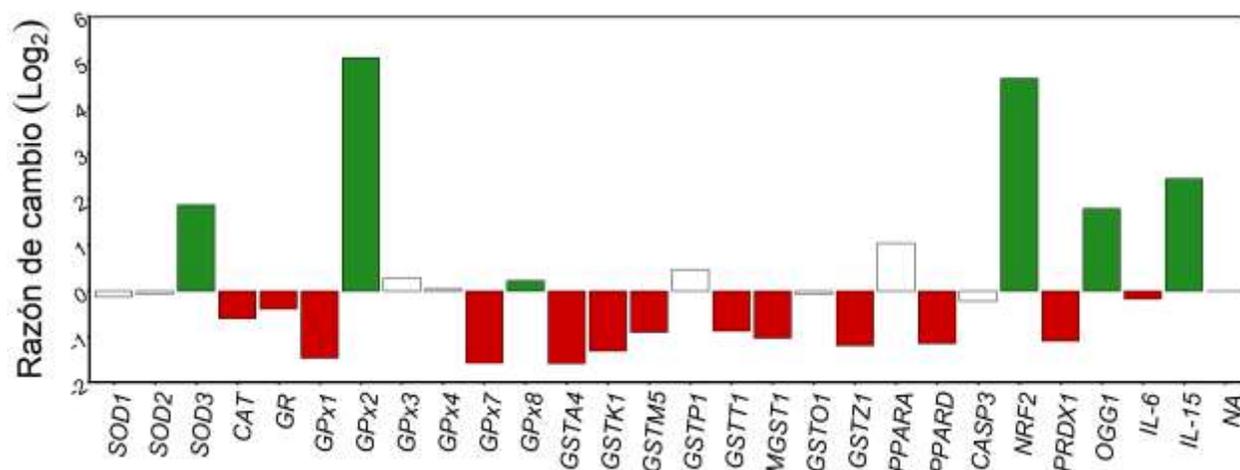


Figura 20. Perfil transcripcional de genes que codifican para enzimas antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S transferasa; y PRDX, peroxirredoxina); factores de transcripción (PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; y NRF2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), marcador de reparación del daño oxidativo (OGG, 8-Oxoguanina ADN glicosilasa), citocinas inflamatorias (IL, interleucinas) e indicadores de muerte celular programada (CASP, caspasa) en células de músculo esquelético de Lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP). Los valores en el eje y se expresan como logaritmo en base 2 de la media de los valores normalizados de expresión (gen de referencia GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Las barras de color sólido representan a los genes que fueron sobreexpresados (verdes) o subexpresados (rojos) en los cultivos expuestos a DEHP; mientras que las barras blancas indican que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para un gen en particular, acorde a la prueba de *Kruskal-Wallis*. La longitud de las barras indica la magnitud de la diferencia en la expresión de un gen de las muestras expuestas a DEHP con respecto al control, estimada como el cociente entre los valores de expresión de los cultivos expuestos a DEHP y los valores de expresión en las muestras control.

Tabla 14. Valores de p-ajustados estimados a partir de la tasa de descubrimiento falso (FDR) para los valores p de la prueba Kruskal-Wallis (KW) realizada sobre las variables de expresión génica de enzimas antioxidantes, marcadores de daño oxidativo, citocinas inflamatorias e indicadores de muerte programada en células de músculo esquelético de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP).

Gen	Valor p (KW)	p-ajustada (FDR)	
		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
Superóxido dismutasa 1	0.487	0.487	0.487
Superóxido dismutasa 2	0.487	0.487	0.487
Superóxido dismutasa 3	0.037	0.052	0.052
Catalasa	0.037	0.052	0.052
Glutación reductasa	0.037	0.052	0.052
Glutación peroxidasa 1	0.037	0.052	0.052
Glutación peroxidasa 2	0.037	0.052	0.052
Glutación peroxidasa 3	0.487	0.487	0.487
Glutación peroxidasa 4	0.487	0.487	0.487
Glutación peroxidasa 7	0.037	0.052	0.052
Glutación peroxidasa 8	0.037	0.052	0.052
Glutación S transferasa alpha 4	0.037	0.052	0.052
Glutación S transferasa kappa 1	0.037	0.052	0.052
Glutación S transferasa miu 1	0.037	0.052	0.052
Glutación S transferasa pi 1	0.487	0.487	0.487
Glutación S transferasa theta 1	0.037	0.052	0.052
Glutación S transferasa microsomal 1	0.037	0.052	0.052
Glutación S transferasa omega 1	0.487	0.487	0.487
Glutación S transferasa zeta 1	0.037	0.052	0.052
PPAR alpha	0.487	0.487	0.487
PPAR delta	0.037	0.052	0.052
Caspasa 3	0.487	0.487	0.487
Factor nuclear eritroide 2	0.037	0.052	0.052
Peroxirredoxina 1	0.037	0.052	0.052
Interleucina 6	0.037	0.052	0.052
Interleucina 15	0.037	0.052	0.052
8-Oxoguanina ADN glicosilasa	0.037	0.052	0.052

7.7 Evaluación del índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

7.7.1 Humano

En las células de músculo esquelético de humanos tratadas con DEHP (1 mM por 13 días) se encontró una mayor área o valores significativamente más altos del IBR en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=103,680$, $p<0.0001$) (Fig. 21). En el IBR la actividad de las enzimas CAT, GPx y GR fueron marcadas como indicadores de la condición de las células de músculo esquelético mantenidas en condiciones control. En los cultivos tratados con DEHP, el IBR marcó la actividad de las enzimas SOD y GST, la producción de $O_2^{\bullet-}$, los niveles de TBARS y carbonilos proteicos como los marcadores clave en esta condición de cultivo.

En cuanto a la expresión génica, se obtuvieron valores significativamente más altos del IBR en los cultivos bajo condiciones control en comparación con los cultivos expuestos a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=504$, $p=0.017$). Los genes *SOD1*, *SOD3*, *CAT*, *GR*, *GPx1*, *GPx2*, *GPx4*, *GPx8*, *GSTA4*, *GSTP1*, *GSTT1*, *PPARA*, *PPARD*, *CASP3*, *NRF2*, *OGG1*, *IL-15* e *IL-16* fueron marcados como indicadores de la respuesta de las células de músculo esquelético cultivadas en condiciones control; mientras que la expresión de *SOD2*, *GPx3*, *GPx7*, *GSTK1*, *GSTM5*, *MGST1*, *GSTO1*, *GSTZ1*, *PRDX1* e *IL-6* fueron detectados como marcadores clave en los cultivos expuestos a DEHP.

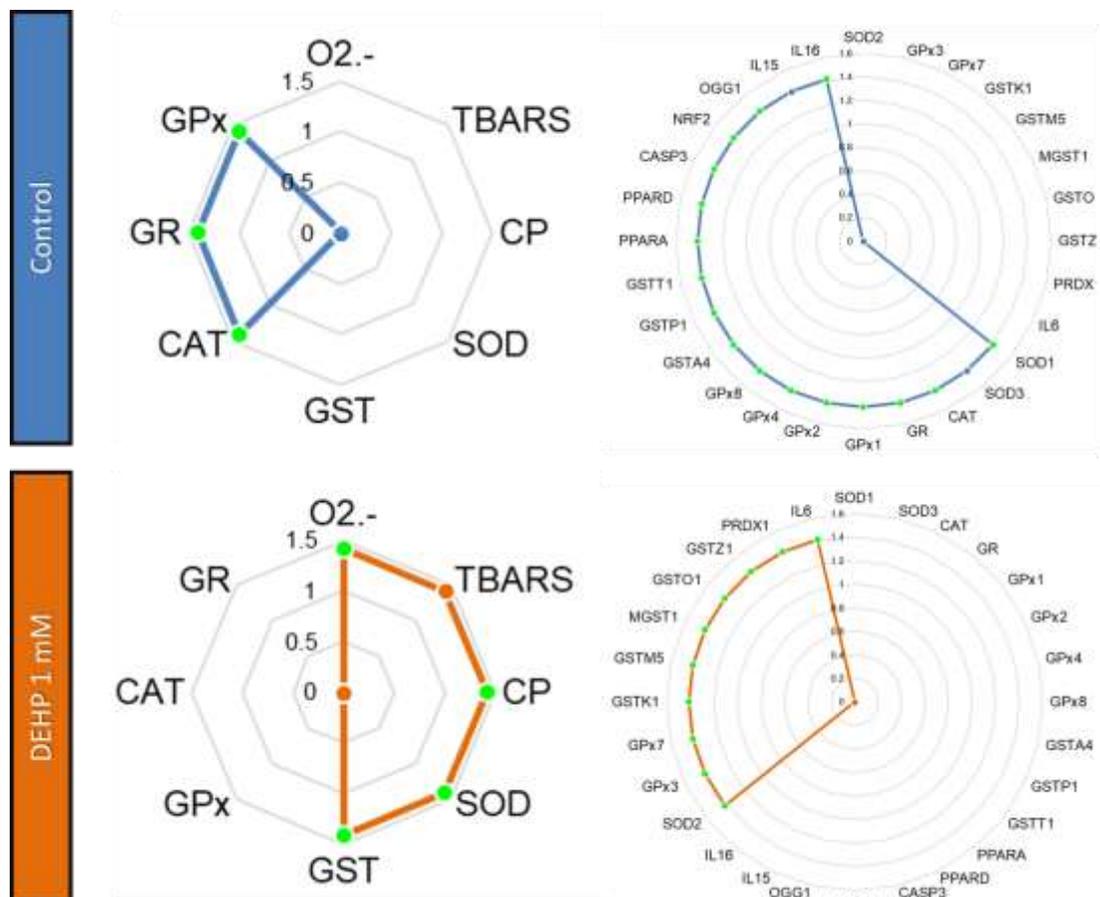


Figura 21. Representación gráfica de los marcadores seleccionados en el índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) para las células musculares de humano (*Homo sapiens sapiens*) bajo cultivo primario expuestas durante 13 días a condiciones control y a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato, (DEHP). Los puntos verdes resaltan aquellas variables que mostraron valores significativamente mayores de acuerdo con la prueba *Mann-Whitney-Wilcoxon* (secciones 7.4.1, 7.5.1 y 7.6.1).

7.7.2 Lobo marino

En las células de músculo esquelético de lobo marino de California tratadas con DEHP a 1 mM por 13 días se encontró una mayor área o valores significativamente más altos del IBR en comparación con las células mantenidas bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=6,220,800$, $p<0.0001$) (Fig. 22). En el IBR la actividad de la enzima GR fue identificada como indicador de las condiciones de las células de músculo esquelético mantenidas en condiciones control. En los cultivos tratados con DEHP, el IBR identificó a la actividad de las enzimas SOD, CAT, GPx y GST, la producción de $O_2^{\bullet-}$, los niveles de TBARS y carbonilos proteicos como los marcadores clave.

En cuanto a la expresión génica, se obtuvieron valores significativamente más altos del IBR en los cultivos bajo condiciones control en comparación con los cultivos expuestos a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=459$, $p=0.030$). Los genes *SOD1*, *SOD3*, *CAT*, *GR*, *GPx1*, *GPx2*, *GPx4*, *GPx8*, *GSTA4*, *GSTP1*, *GSTT1*, *PPARA*, *PPARD*, *CASP3*, *NRF2*, *OGG1*, *IL-15* e *IL-16* fueron marcados como indicadores de la respuesta de las células de músculo esquelético cultivadas en condiciones control; mientras que la expresión de *SOD2*, *GPx3*, *GPx7*, *GSTK1*, *GSTM5*, *MGST1*, *GSTO1*, *GSTZ1*, *PRDX1* e *IL-6* fueron detectados como marcadores clave en los cultivos expuestos a DEHP.

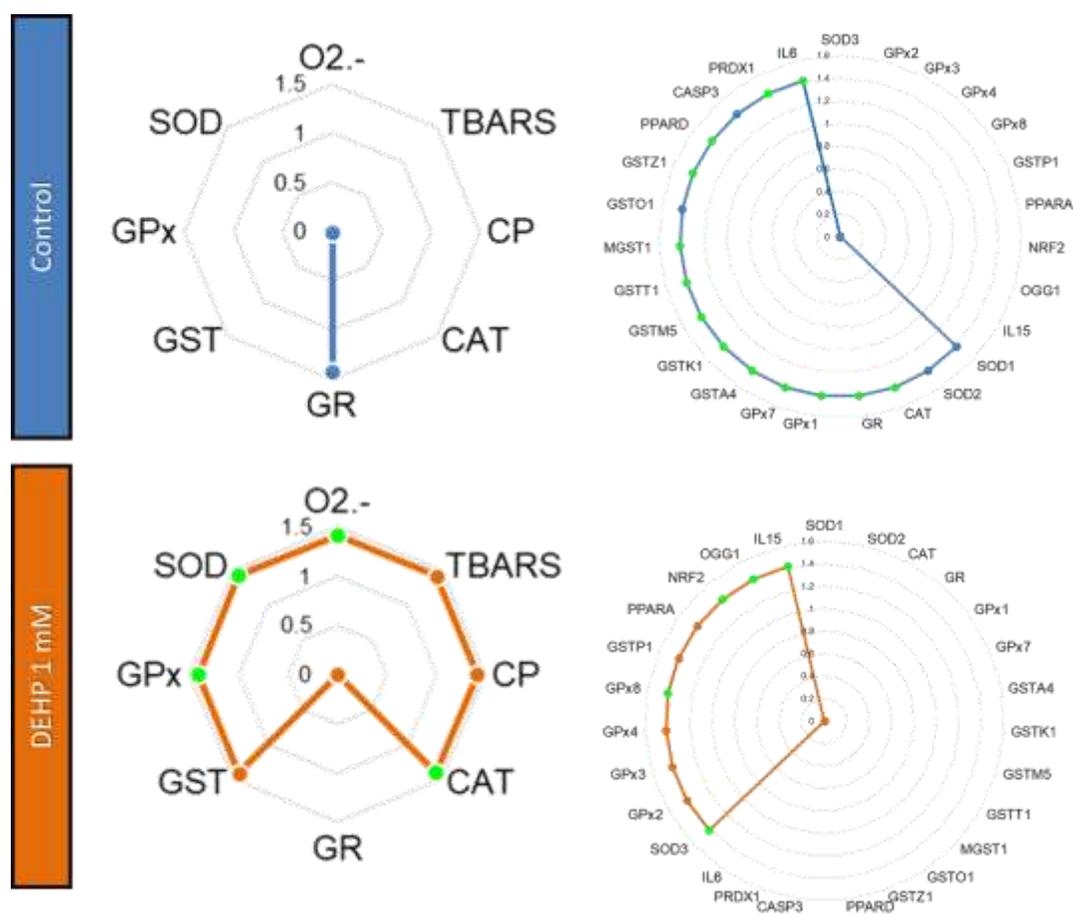


Figura 22. Representación gráfica de los marcadores seleccionados en el índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) para las células musculares de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) bajo cultivo primario expuestas durante 13 días a condiciones control y a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato, (DEHP). Los puntos verdes resaltan aquellas variables que mostraron valores significativamente mayores de acuerdo con la prueba *Mann-Whitney-Wilcoxon* (secciones 7.4.2, 7.5.2 y 7.6.2).

7.8 Comparación entre especies

7.8.1 Actividad enzimática, producción de radical superóxido, niveles de daño oxidativo y perfil de transcripción entre especies

En la figura 23 se presentan las variables indicadoras de estrés oxidativo cuantificadas en células de músculo esquelético en cultivo primario bajo condiciones control y después de la exposición a 1 mM de DEHP por 13 días en las que se detectaron diferencias entre especies. La producción de $O_2^{\bullet-}$ fue mayor en las células musculares de humano, en comparación con las del lobo marino de California, bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=315$, $p<0.001$); sin embargo, no se encontraron diferencias entre especies en los cultivos expuestos a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=125$, $p=0.325$). La concentración de TBARS fue significativamente mayor en las células musculares de lobo marino de California, con respecto a las muestras de humano, tanto en condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=38$, $p<0.001$) como tras la exposición a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=10$, $p<0.001$). La concentración de carbonilos proteicos fue mayor en las células de músculo esquelético de humano, con respecto a las células de lobo marino de California, en condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=325$, $p<0.001$) y después de la exposición a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=325$, $p<0.001$).

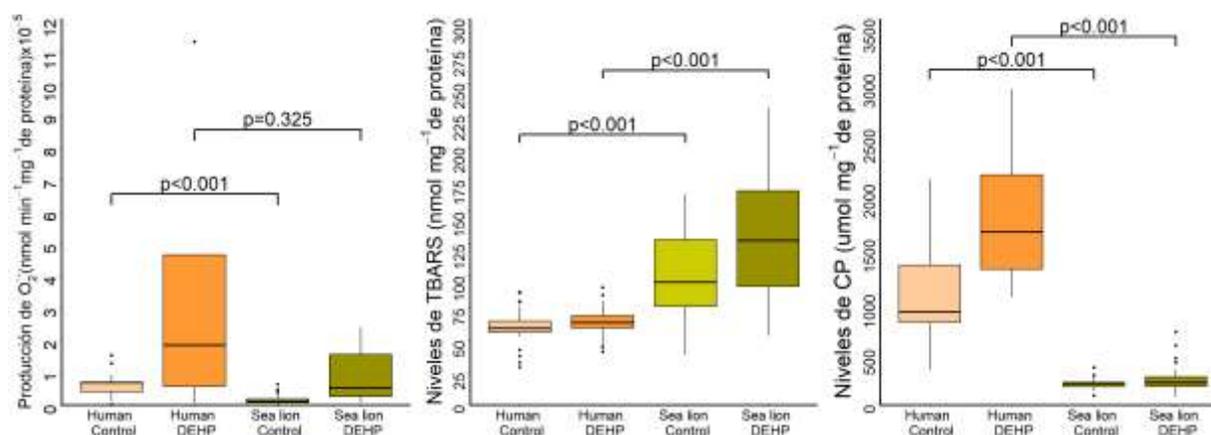


Figura 23. Producción de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$, nanomoles por miligramo de proteína por minuto) y marcadores de daño oxidativo a lípidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS, nanomoles por miligramo de proteína) y a proteínas (carbonilos proteicos, CP, micromoles por miligramo de proteína) en cultivos primarios de células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM). Las diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$), mostradas en el gráfico, corresponden a la prueba de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. Los puntos grises en el gráfico representan datos atípicos.

En la figura 24 se muestran los resultados de la actividad enzimática en donde se encontraron diferencias estadísticas en la respuesta de células de músculo esquelético de humano y lobo marino de California en cultivo primario bajo condiciones control y después de la exposición a 1 mM de DEHP por 13 días. La actividad de la enzima SOD fue mayor en células de lobo marino de California bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=0$, $p<0.001$) y expuestas a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=16$, $p<0.001$). La actividad de GPx fue mayor en células musculares de humano en comparación con los cultivos de lobo marino de California en ambas condiciones de cultivo, control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=324$, $p<0.001$) y exposición a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=284$, $p<0.001$). La actividad de CAT en las células musculares de humanos fue mayor en comparación con las muestras de lobo marino de California en los cultivos primarios bajo condiciones control (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=254$, $p<0.012$). Luego de la exposición a DEHP, las células de humano mostraron menor actividad de CAT en comparación con las células de lobo marino de California (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=33$, $p<0.001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de GR entre especies por tratamientos. La actividad de GST fue mayor en las células de músculo esquelético de lobo marino de California que en las de humanos tras la exposición a 1 mM de DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=87$, $p=0.042$); bajo condiciones control no se encontraron diferencias significativas entre especies en los cultivos expuestos a DEHP (*Mann-Whitney-Wilcoxon* $W=149$, $p=0.731$).

En la figura 25 se muestra la comparación entre especies (humano y lobo marino de California) en términos del perfil de transcripción de los genes de interés previamente descritos en las secciones 7.6.1 y 7.6.2.

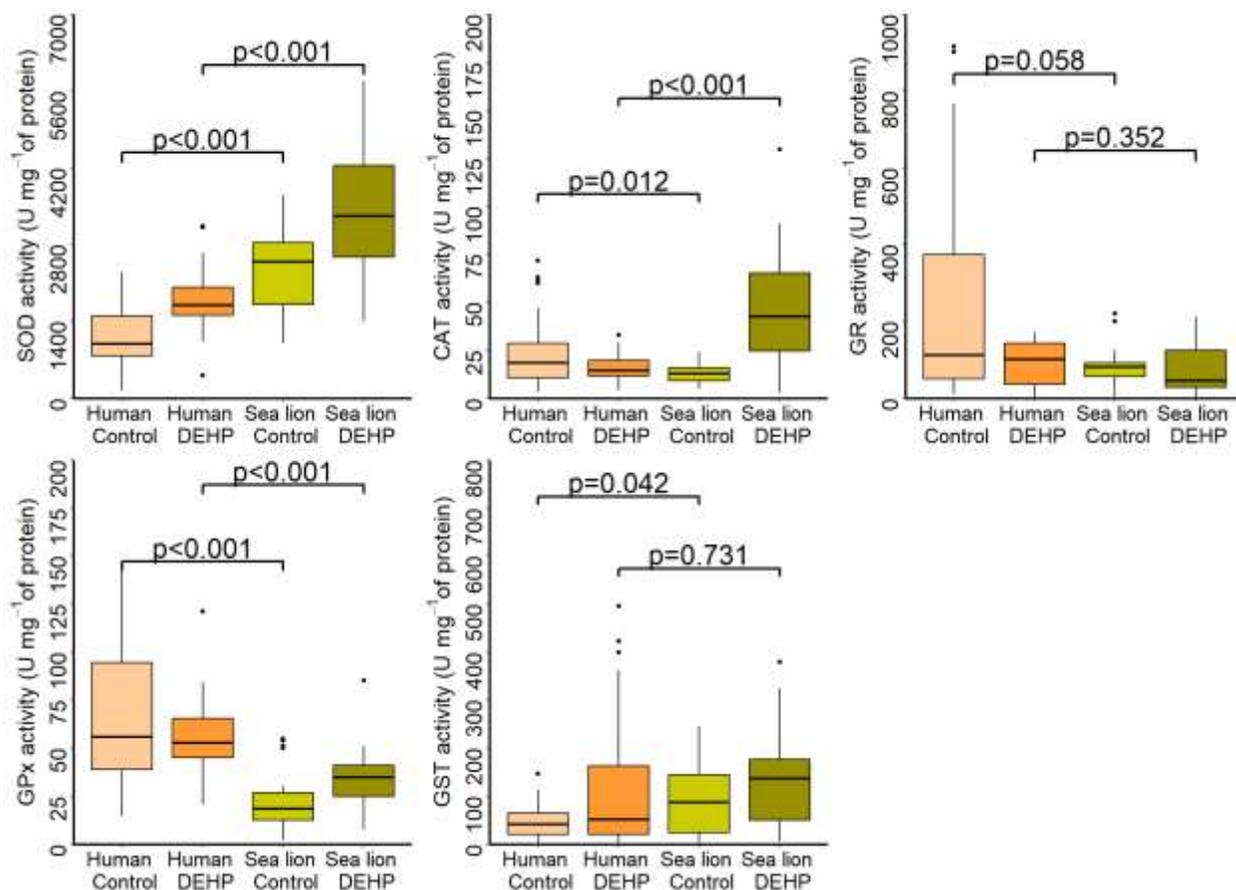


Figura 24. Actividad de las enzimas antioxidantes en cultivos primarios de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y exposición a 1 mM de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP). SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GST, glutatión S-transferasa; GR, glutatión-disulfuro reductasa; CAT, catalasa. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) corresponden a la prueba de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. Los resultados se muestran en unidades por miligramo de proteína. Los puntos grises en el gráfico representan datos atípicos.

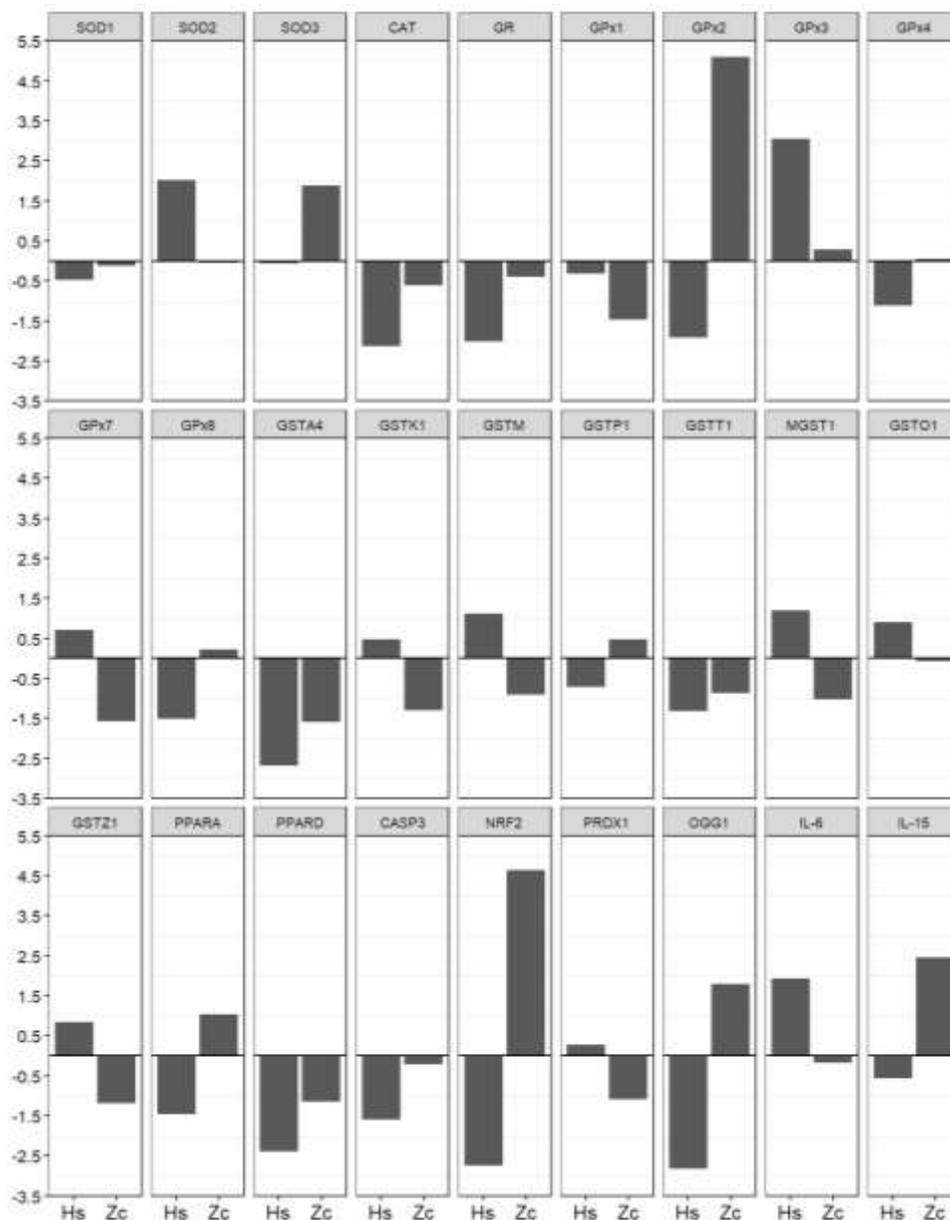


Figura 25. Perfil transcripcional de genes que codifican para enzimas antioxidantes, marcadores de daño oxidativo, citocinas inflamatorias e indicadores de muerte programada en células de músculo esquelético de humanos (*Homo sapiens sapiens*, Hs) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*, Zc) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) con respecto a las células mantenidas en condiciones control (sin DEHP). Los valores en el eje y se expresan como logaritmo en base 2 de la media de los valores normalizados de expresión. Las barras por encima y debajo del cero representan a los genes que fueron sobreexpresados y subexpresados, respectivamente, en los cultivos expuestos a DEHP.

7.8.2 Análisis Discriminante Lineal (ADL)

Los ADL realizados, discriminaron de manera significativa las células musculares entre especies tanto para aquellas mantenidas bajo condiciones control ($\text{Lambda de Wilks}=0.119$, $\chi^2=93.648$, $p<0.001$) como bajo la exposición a DEHP ($\text{Lambda de Wilks}=0.128$, $\chi^2=90.191$, $p<0.001$) con una precisión de clasificación del 100% en ambos casos (Fig. 26). En el análisis de las muestras control, tres de las ocho variables incluidas en el análisis aportaron información significativa para discriminar la respuesta de las células musculares de humano y lobo marino de California. En el caso de los cultivos expuestos a DEHP (1mM), únicamente dos de 8 variables contribuyeron en la separación de especies (Tabla 15).

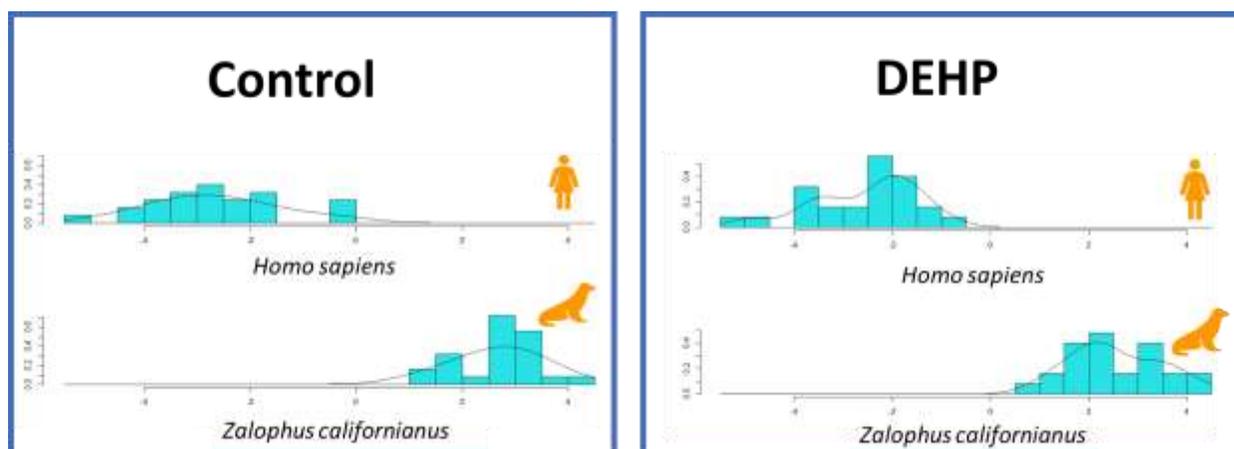


Figura 26. Representación gráfica de las puntuaciones discriminantes que incluyen los biomarcadores de actividad enzimática, producción de radical superóxido y niveles de daño oxidativo a proteínas y lípidos en muestras de cultivos primarios de células musculares de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) expuestos durante 13 días a condiciones control y a exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM).

Tabla 15. Resumen de las variables significativas ($p < 0.05$) dentro de las funciones discriminantes obtenidas del análisis discriminante lineal (ADL) para las variables de actividad enzimática, producción de radical superóxido y niveles de daño oxidativo a lípidos y proteínas en células de músculo esquelético de humano (*Homo sapiens sapiens*) y lobo marino de California (*Zalophus californianus*) en cultivo primario, en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP, 1 mM por 13 días) y bajo condiciones control (sin DEHP).

Condición de cultivo	Biomarcador	Lambda de Wilks	F de Fisher	p
Control	Superóxido dismutasa	0.1983	94.99	<0.001
	Radical superóxido	0.1382	95.61	<0.001
	Carbonilos proteicos	0.3686	82.20	<0.001
DEHP	Superóxido dismutasa	0.1502	132.90	<0.001
	Carbonilos proteicos	0.2146	175.58	<0.001

Los coeficientes estandarizados estimados para las dos funciones discriminantes (F_d) obtenidas a partir del ADL son los siguientes:

Control

$$F_d = 0.195 (SOD) + 0.384 (CAT) - 0.182 (GR) - 0.461 (GPx) + 0.216 (GST) - 0.758 (O_2^{\bullet-}) + 0.458 (TBARS) - 1.945 CP \quad (16)$$

Donde CP corresponde a la variable carbonilos proteicos,

DEHP

$$F_d = 0.903 (SOD) + 0.423 (CAT) - 0.273 (GR) - 0.265 (GPx) + 0.070 (GST) + 0.235 (O_2^{\bullet-}) - 0.188 (TBARS) - 1.880 CP \quad (17)$$

Donde CP corresponde a la variable carbonilos proteicos.

8. DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en analizar y comparar de forma conjunta el efecto de la exposición a DEHP a una concentración conocida (1 mM), en términos de la producción de $O_2^{\bullet-}$, niveles de TBARS, carbonilos proteicos, actividad antioxidante (SOD, CAT, GR, GPx, GST) y la expresión de genes relacionados a estrés oxidativo, en células musculares en cultivo primario tanto de humano, como de lobo marino de California. El efecto de la exposición a ftalatos sobre la producción de especies reactivas en células musculares ha sido reportado únicamente en murinos (mioblastos C2C12, MEHP 0.8 mM) (Chen et al. 2020). Los resultados del presente estudio contribuyen al conocimiento científico actual sobre los efectos del plastificante DEHP en células musculares humanas y en una especie de vida silvestre, el lobo marino de California.

Este estudio es pionero en la investigación de las respuestas celulares inducidas por DEHP en pinnípedos, ofreciendo valiosos conocimientos. Otros estudios en mamíferos marinos, específicamente cetáceos, incluyen la exposición ambiental a ftalatos (Hart et al. 2020), la respuesta del cultivo de células cutáneas a la exposición a DEHP (5 mM) (Giovani et al. 2022), los niveles de DEHP en grasa (Routti et al. 2021), los metabolitos de ftalatos detectables en orina (Dziobak et al. 2021) y la acumulación de estos compuestos nocivos en las presas del delfín jorobado del Indo-Pacífico (*Sousa chinensis*) (Xie et al. 2023). Nuestro trabajo sienta las bases para una mayor investigación sobre el impacto del DEHP en los mamíferos marinos. Los pinnípedos son considerados centinelas de los ecosistemas marinos (Moore 2008), por lo que investigar vías específicas de detoxificación y respuesta antioxidante, puede contribuir al conocimiento sobre posibles efectos a largo plazo y posibles estrategias de mitigación acerca de los efectos del DEHP en especies silvestres. Además, comprender la susceptibilidad de los mamíferos marinos al DEHP puede contribuir a la evaluación de riesgos para sus poblaciones.

Comparar los efectos del DEHP en los pinnípedos con los de otros mamíferos, como los humanos, evidencia las diferencias en las respuestas adaptativas de cada especie frente a xenobióticos ambientales. Este trabajo aporta valiosos conocimientos al campo de la ecotoxicología y la salud ambiental, y sienta las bases para futuras investigaciones que permitan comprender cómo interactúa el DEHP con diversas especies y ecosistemas.

8.1 Determinación de la dosis de di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) para los bioensayos y su efecto en la viabilidad de células musculares

Se utilizó una mayor concentración de DEHP (1000 μM) para medir la respuesta de las células musculares de humano, en comparación con otros ensayos sobre cultivos primarios de células humanas, incluyendo hepatocitos (500 μM , DEHP) (Goll et al. 1999) y células endometriales (0.001 μM DEHP) (Cho et al. 2015). La exposición a 1000 μM redujo la viabilidad celular de los cultivos musculares de humano y lobo marino de California en un 69 y 79%, respectivamente. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han encontrado que el DEHP es citotóxico para otras especies de mamíferos. Liu et al. (2022) encontraron que al exponer mioblastos de ratón (línea celular C2C12) a 600 μM de DEHP por 24 horas, la viabilidad celular se reduce en un 60-70%. En cultivos primarios de células epiteliales de tursiión (*Tursiops truncatus*), se observó que la exposición a DEHP (5000 μM) por 24 horas reduce la viabilidad celular en un 70% aproximadamente (Giovani et al. 2022). Las células epiteliales de delfín muestran una resistencia, en términos de viabilidad y proliferación celular, a la exposición a DEHP en comparación con células de ovario de hámster chino (línea celular CHO) (*Cricetulus griseus*) (Giovani et al. 2022). La concentración de DEHP necesaria para generar el mismo efecto en la disminución de la viabilidad celular en cultivos primarios de músculo esquelético podría ser distinta entre especies terrestres y marinas.

8.2 Efectos de la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) en la morfología, regeneración y proliferación celular de células de músculo esquelético en cultivos primarios

Las células musculares de humano y lobo marino de California mostraron cambios estructurales luego de exponer los cultivos primarios a DEHP (1 mM) por 13 días. Algunas de las alteraciones observadas fueron disminución de la confluencia celular, cambios en el volumen de células satélite, formación de cuerpos de estrés y disrupción de la membrana nuclear. Los cambios observados en la confluencia y volumen celular pueden estar relacionados a la acidificación del medio adicionado con DEHP (Yu et al. 2019), ya que la disminución del pH genera cambios en la morfología de las células musculares, disminuyendo su volumen y aumentando los espacios intercelulares (April et al. 1972).

Entre el séptimo y octavo día de bioensayo, la exposición a DEHP promueve la producción de cuerpos o gránulos al interior de las células (Fig. 9 y 12), estos cuerpos se observan en el citoplasma, principalmente alrededor del núcleo. El origen de estos cuerpos no fue confirmado, sin embargo, de acuerdo a la literatura, podría tratarse de cuerpos apoptóticos producidos a consecuencia de la disfunción celular (Alberts 2013). Alternativamente, estos cuerpos pudieran ser gotas lipídicas que actúan como citoprotectores frente a la peroxidación lipídica (Jarc y Petan 2019), o peroxisomas, también agentes citoprotectores que se producen de manera masiva bajo procesos de estrés (Elcombe y Mitchell 1986; Su et al. 1998; Lapinskas et al. 2005). Finalmente, podría tratarse de gránulos de estrés, los cuales forman parte de los mecanismos de protección celular y se componen de agregados de proteínas y ARN (Ravel-Chapuis et al. 2016). Estos gránulos de estrés se producen de manera masiva en el citosol de mioblastos de ratón (C2C12) tratados con arsénico (0.5 mM), siendo más evidentes luego de 45 minutos de exposición al xenobiótico (Ravel-Chapuis et al. 2016). Los gránulos de estrés pueden formarse en diferentes etapas de diferenciación de células musculares expuestas a 200 μM de MEHP (Chen et al. 2020).

Los cambios estructurales observados en el núcleo son consistentes con investigaciones previas sobre los efectos adversos del DEHP (1 mM o 1000 μM) en cultivos primarios de músculo esquelético de humano, en los que se reportó un incremento significativo en el diámetro (μm) nuclear y de los nucleolos (Hernández-Almaraz et al. 2022), lo cual sugiere procesos de condensación del material génico y muerte celular por exposición a DEHP (Roberts et al. 1995; Rusyn et al. 2006). Las alteraciones celulares observadas podrían estar relacionadas a la disminución de la viabilidad celular en los cultivos expuestos a DEHP de humano (\bar{x} =69% viabilidad) y de lobo marino de California (\bar{x} =79% viabilidad).

En hemocitos de langostino de Malasia (*Macrobrachium rosenbergii*) expuestos a una concentración de 100 mg mL^{-1} de DEHP (256,039.98 μM) se observó que, luego de 10 minutos de exposición, las células aumentan la producción de radical superóxido y presentan alteraciones en la morfología del núcleo (aumento en volumen), vacuolización e incrementa la muerte celular (Sung et al. 2003). A diferencia del langostino, en el humano y lobo marino las

alteraciones morfológicas fueron más evidentes luego de 13 días de exposición a DEHP. La capacidad del músculo esquelético frente a la citotoxicidad del DEHP podría deberse a las características propias del músculo. El músculo esquelético es un tejido metabólicamente activo, por lo que posee una alta demanda energética en comparación con otras células (Kanatous et al. 1999; Ravussin y Smith 2006). Esta adaptación podría proveer al músculo de una mayor resistencia a la exposición a contaminantes que requieren de mayor producción de energía para su detoxificación (Saraiva et al. 2020), como los ftalatos (Huang et al. 2021).

La capacidad regenerativa de células musculares, en términos de frecuencia absoluta de células satélite fue significativamente menor en células de humano ($p < 0.001$) (fig. 10) luego de 13 días de exposición a DEHP (1 mM). La exposición de mioblastos (C2C12) de murinos a 800 μM de mono (2-etilhexil) ftalato (MEHP, metabolito primario del DEHP) por dos días, altera la función mitocondrial y bloquea la absorción de glucosa inducida por la insulina (Chen et al. 2020). Cuando las células satélite carecen de energía, no logran activarse, dividirse o diferenciarse en mioblastos (Abreu y Kowaltowski 2020). En el presente estudio, la exposición de células musculares de humano a DEHP (1 mM) por 13 días podría relacionarse no sólo a la reducción de la viabilidad celular, sino también a la disminución de la capacidad regenerativa de las células en cultivo primario. En procesos naturales como el envejecimiento, la pérdida de la capacidad regenerativa del músculo puede llevar a condiciones de atrofia muscular, como la sarcopenia (Yin et al. 2013), condición cuya prevalencia en humanos adultos ha sido asociada a la exposición a ftalatos (Yang et al. 2022).

La exposición a DEHP no disminuyó la capacidad de regeneración (frecuencia de células satélite) de las células de músculo esquelético de lobo marino de California en condiciones de cultivo primario ($p < 0.001$) (fig. 13). En mamíferos, la regeneración muscular involucra procesos inflamatorios, activación y proliferación de células satélite, así como diferenciación y fusión de mioblastos, que culminan en la restauración de la función muscular (Yin et al. 2013). Por lo anterior, el aumento en la capacidad regenerativa de las células musculares de lobo marino de California pudiera estar asociado a procesos moleculares de señalización celular dirigidos a la

proliferación de células satélite, como la sobreexpresión de *IL-15* ($p < 0.05$), gen involucrado en la respuesta regenerativa del músculo (Nielsen et al. 2007).

En las dos especies analizadas se observó una reducción significativa en la tasa de proliferación de células musculares expuestas a DEHP (1 mM), con respecto al control (Fig. 11 y 14). Los modelos obtenidos muestran como la tasa de proliferación de los cultivos expuestos a DEHP se reduce a lo largo del bioensayo (13 días). Estos resultados podrían estar relacionados a una disminución en la tasa de reclutamiento de las células musculares expuestas a DEHP. Chen et al. (2013) observaron que en células C2C12, bajo condiciones de cultivo, la expresión del factor de transcripción miogenina disminuye significativamente a partir del tercer día de exposición a DEHP (2.560 mM) y, con ello, disminuyen los procesos de miogénesis. A partir de los resultados del presente estudio en relación con la tasa de proliferación de células musculares expuestas a DEHP (1 mM por 13 días; pendientes positivas en ambas especies), se sugiere que la exposición al DEHP reduce la velocidad a la que las células musculares se dividen, pero no detiene completamente la división de células musculares de humano ni de lobo marino de California en cultivo primario.

Cerca del 40% de la masa corporal en el humano corresponde a músculo esquelético (Janssen et al. 2000; Hill y Olson 2012). El músculo funge como reservorio de DEHP y MEHP (Kluwe 1982; Standaert 1988). El papel del músculo esquelético, a diferencia de aquél de órganos como hígado e intestino delgado, en el metabolismo de ftalatos aún no se conoce del todo (Molina-Ortiz et al. 2013). Por lo anterior, sería interesante abordar la participación del músculo esquelético en el metabolismo del DEHP desde un enfoque integrativo donde puedan compararse las observaciones morfológicas de los cultivos celulares con marcadores moleculares. Se recomienda el uso de material de laboratorio libre de ftalatos (Reid et al. 2007) para mejorar el rendimiento y calidad de los cultivos celulares, así como la veracidad de los resultados obtenidos a partir de los bioensayos.

8.3 Indicadores de estrés oxidativo y expresión génica

En este análisis, la exposición por 13 días a DEHP (1 mM) incrementó de forma significativa la producción de $O_2^{\bullet-}$ y la actividad de la enzima SOD en las células musculares en cultivo primario de humano y lobo marino de California. La actividad de SOD en los cultivos control fue mayor en lobo marino de California que en humano ($p < 0.05$). La actividad enzimática de CAT, GR y GPx fue significativamente menor ($p < 0.05$), al igual que la expresión génica de *SOD1*, *CAT*, *GR*, *GPx1*, *GPx2*, *GPx4*, *Gpx8*, *NRF2* y *OGG1* ($p < 0.001$) en células musculares de humano ($p < 0.05$); mientras que en el lobo marino de California la actividad de CAT y GPx fue mayor, al igual que la expresión de *GPx2*, *GPx8*, *NRF2* y *OGG1* ($p < 0.001$) después de la exposición a DEHP. En conjunto, estos resultados respaldan el papel de las especies reactivas como disruptores del equilibrio redox (Fulle et al. 2004; Zhou et al. 2013) mediante la alteración de la expresión génica (Greene et al. 2015), activación de vías de desintoxicación e inflamación (Barbieri y Sestili 2012) e induciendo daño oxidativo a proteínas (Møller et al. 2011), en las células de músculo esquelético particularmente en las de humanos. La actividad catalítica de SOD para dismutar al $O_2^{\bullet-}$ pudo aumentar la producción de H_2O_2 , el cual participa en procesos de señalización celular (Halliwell y Gutteridge 2015). Un incremento en la producción de H_2O_2 puede ocasionar la inhibición competitiva de CAT (Ma et al. 2017); la oxidación de glutatión (GSH) (Winterbourn y Metodiewa 1999), tripéptido esencial para la actividad de las enzimas GR y GPx, y la oxidación de isoformas de SOD sensibles a la presencia de H_2O_2 (SOD1 y SOD3) (Mayer y Falkinham 1986). A partir de los resultados del presente estudio, se sugiere que las consecuencias de la sobreproducción de $O_2^{\bullet-}$ inducido por la exposición a DEHP dependen de la especie (tolerancia a procesos de estrés oxidativo), del contenido de antioxidantes endógenos y de la capacidad de las células en cultivo de inducir a los elementos de respuesta antioxidante.

La producción de especies reactivas por la exposición a DEHP pudo activarse por distintas vías. Una vía es la activación de la NADPH oxidasa (NOX), una enzima que produce $O_2^{\bullet-}$ como subproducto. La NOX puede ser activada por el DEHP por la inducción de la expresión de genes que codifican para las NOX (Guo et al. 2023). Otras vías son la despolarización de la membrana

mitocondrial (Chen et al. 2020), así como la inhibición de las defensas antioxidantes (Cho et al. 2015).

La exposición a DEHP (1 mM) durante 13 días no causó daño oxidativo significativo a lípidos (TBARS) en cultivos primarios de músculo esquelético de humano o de lobo marino de California ($p>0.05$). Al comparar los niveles de TBARS entre especies, encontramos que tanto en los controles como en los cultivos expuestos a DEHP existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0.001$).

El músculo esquelético tiene mecanismos intrínsecos de reparación y eliminación de daños (Alway et al. 2023). La activación de la vía de desintoxicación contribuye a la eliminación de hidroperóxidos gracias a la actividad de las enzimas de fase II, incluyendo a las GSTs (Pontén et al. 2008). Tras la exposición a DEHP, aumentó la actividad de GST y la expresión génica de las isoformas *GSTM1*, *GSTK1* y *MGST1*, *GSTO1*, *GSTZ1* ($p<0.001$) en células de músculo esquelético de humano. Esto podría conducir a una reducción efectiva de hidroperóxidos, lo que podría proteger contra el daño oxidativo a macromoléculas (Pontén et al. 2008; Uhlén et al. 2015). Asimismo, la expresión de *GPx4* y *PRDX1* fue mayor en las células musculares de humano expuestas a DEHP, en comparación con las mantenidas en condiciones control ($p<0.001$), lo que podría estar relacionado con la eliminación de hidroperóxidos y H_2O_2 , respectivamente (Pontén et al. 2008). La actividad de GST y la expresión génica de ciertas isoformas de GST, GPx y PRDX podrían contribuir a reducir el riesgo de procesos celulares degenerativos en el músculo esquelético al reducir los niveles de hidroperóxidos. En humanos, tanto la actividad como la expresión génica de la familia GST nos habla de la activación de la fase dos de detoxificación, en la que la batería enzimática de GST conjuga al MEHP para convertirlo en metabolitos secundarios hidrosolubles menos reactivos (Liska 1998; Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2019).

En células de músculo esquelético de humano el incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ fue asociado a un incremento en los niveles de carbonilos proteicos ($p<0.001$). En contraste, en células de músculo esquelético de lobo marino de California, la exposición a DEHP (1 mM, 13

días) no generó cambios significativos en los indicadores de daño oxidativo a proteínas o lípidos. En comparación con especies terrestres, los mamíferos marinos cuentan con mayores niveles endógenos de antioxidantes (Vázquez-Medina et al. 2006, 2012; Cantú-Medellín et al. 2011; Zenteno-Savín et al. 2011; Allen et al. 2019). En la foca de capucha (*Cystophora cristata*), se han asociado altos niveles de ERO con vías de señalización mediadas por oxidantes que inducen la respuesta antioxidante sin aumentar el daño oxidativo a proteínas, lípidos o ADN (Vázquez-Medina et al. 2006; Allen et al. 2019). Esta capacidad antioxidante podría proveerle a las células musculares de lobo marino de California de una ventaja adaptativa frente al estrés oxidativo inducido por la exposición a DEHP.

En los cultivos expuestos a DEHP en este estudio, la acumulación de carbonilos proteicos fue mayor en células musculares de humano que en las células de lobo marino de California ($p < 0.001$). El aumento en los niveles de carbonilos proteicos puede activar varias vías de señalización (Curtis et al. 2012). Los compuestos electrofílicos, incluidos los carbonilos proteicos, potencializan la activación de la proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (KEAP1) (Hong et al. 2009; Wei et al. 2020), promoviendo la ubiquitinación y degradación del NRF2. La activación de NRF2 se ha relacionado con una disminución en la producción y acumulación de carbonilos proteicos (Nishimoto et al. 2017). En el presente estudio, la expresión génica de *NRF2* fue significativamente menor ($p < 0.001$) en células de músculo esquelético de humano tras la exposición a DEHP, lo que sugiere que la exposición a este plastificante y los niveles de carbonilos proteicos pudieron interrumpir el equilibrio dinámico entre la activación y eliminación de NRF2.

Después de la exposición a DEHP (1 mM) las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx ($p < 0.05$), así como la expresión génica de *SOD3*, *GPx2*, *GPx8* y *NRF2* ($p < 0.001$) aumentaron significativamente en células de músculo esquelético de lobo marino de California. En cambio, tras la exposición a DEHP, las actividades de las enzimas antioxidantes SOD y GST ($p < 0.05$) y la expresión génica de *SOD2*, *GPx3*, *GPx7*, *GSTK1*, *GSTM1*, *MGST1*, *GSTO1* y *GSTZ1* aumentaron en células de músculo esquelético de humano. En conjunto, los resultados del presente estudio sugieren que la exposición a DEHP (1 mM) luego de 13 días provoca la

activación de diferentes vías de respuesta en las células del músculo esquelético de mamíferos marinos y terrestres. De acuerdo con las fases de detoxificación, los metabolitos intermediarios, productos de la fase I de detoxificación, inducen la producción de especies reactivas, activando la respuesta antioxidante; estos metabolitos pronto entran en la etapa final de detoxificación (fase II) y son conjugados por enzimas como la GST (Liska 1998). Si bien las células del músculo esquelético humano responden a la exposición a DEHP iniciando las vías de desintoxicación de fase II, las células del músculo esquelético de lobo marino de California evitan el daño oxidativo a proteínas y lípidos al aumentar los mecanismos de hidrólisis xenobiótica y eliminación de ERO. En las células de mamíferos, SOD, CAT y GPx constituyen la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo, ya que desempeñan un papel clave como parte de los mecanismos de defensa antioxidante (Ighodaro y Akinloye 2018). Estas enzimas se encuentran reguladas por el NRF2, involucrado en la regulación de la expresión génica dependiente de antioxidantes (Ma 2013). De acuerdo con los resultados del presente estudio, así como con la literatura disponible, la exposición a DEHP induce una respuesta antioxidante (fase I de detoxificación) en las células de músculo esquelético de los lobos marinos de California, mientras que en las células de músculo esquelético de humanos la exposición a DEHP activa la fase II del proceso de detoxificación.

La expresión génica de *SOD2* y *SOD3* fue mayor en las células de músculo esquelético expuestas a DEHP de humano y de lobo marino de California, respectivamente ($p < 0.05$). La expresión diferencial entre isoformas de SOD podría ser indicativo del nivel de estrés y daño oxidativo inducido por la exposición a DEHP en los cultivos celulares de humano y lobo marino de California. En los mamíferos, las isoformas de SOD (*SOD1* y *SOD3* dependientes de cobre y zinc, y *SOD2* dependiente de manganeso) se subdividen en distintos compartimentos subcelulares (Alberts 2013). La *SOD1* es la isoforma más abundante, se localiza principalmente en el citosol, pero se le puede encontrar en otros organelos, como el núcleo, lisosomas, peroxisomas, y en el espacio intermembranoso mitocondrial (Crapo et al. 1992; Okado-Matsumoto y Fridovich 2001; Wang et al. 2018). La *SOD2* se localiza exclusivamente en las mitocondrias (Suzuki 2000) y se expresa en la mayoría de los tipos de células (Banci et al. 2013). Las células del músculo esquelético tienen una alta densidad mitocondrial (Kanatous et al. 1999; Ravussin y Smith 2006) y una alta expresión de la proteína *SOD2* en comparación con *SOD1* y *SOD3* (Pontén et al. 2008;

Uhlén et al. 2015). La isoforma SOD3 se secreta desde el citosol al espacio extracelular (Fukai 2002) y se encuentra asociada a la recuperación del músculo esquelético, como mediadora de la activación de la transducción de señales de mitógenos y concomitante aumento de la proliferación de células satélite (Laatikainen et al. 2010).

En células de músculo esquelético de humanos, el aumento de la expresión de la isoforma *SOD2* podría contribuir a la actividad de la enzima SOD2 disponible para dismutar $O_2^{\bullet-}$, aumentando los niveles de H_2O_2 y, potencialmente, activando las vías de señalización de especies reactivas (Wang et al. 2018). El aumento en la producción de H_2O_2 puede activar al inositol trifosfato (IP3), un segundo mensajero que participa en la señalización para muerte celular programada (Harr y Distelhorst 2010; Decuypere et al. 2011). Cuando el daño oxidativo mitocondrial es severo, pueden ocurrir vías de muerte celular distintas de la apoptosis (Giorgi et al. 2008; Pinton et al. 2008). En el presente estudio, la disminución de la expresión del gen *CASP3* sugiere una vía de muerte celular independiente de la apoptosis en las células de músculo esquelético de humano expuestas a DEHP. Yang y Stockwell (2016) describieron la relación entre la inhibición de *GPx4* y la activación de la ferroptosis. La subexpresión de *GPx4* y *CASP3*, el incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ y la reducción en la viabilidad celular observada en el presente estudio podrían sugerir que una vía de muerte celular inducida por estrés oxidativo, como la ferroptosis, puede ocurrir en células del músculo esquelético humano expuestas a DEHP.

En el presente estudio, la actividad de GST fue significativamente mayor en las células del músculo esquelético humano expuestas a DEHP (compuesto químico de ácido ftálico) que en aquellas mantenidas en condiciones de control. Asimismo, los niveles de transcripción de *GSTM1*, *GSTK1*, *MGST1*, *GSTO1* y *GSTZ1* incrementaron con respecto al control en las células expuestas a DEHP (1 mM). Esta respuesta no fue observada en las muestras de lobo marino de California. El incremento en actividad de GST y expresión génica de las GSTs sugiere que esta familia está involucrada en los procesos de conjugación del DEHP y remoción de los productos oxidados resultantes en las células musculares de humano. En células de mamíferos, ocho isoformas de la familia GST se encuentran distribuidas en el citosol, las mitocondrias y el retículo endoplasmático (Josephy 2006; Uno et al. 2013). Las isoformas *GSTM*, *GSTK* y *MGST* participan

tanto en los procesos de desintoxicación de un agente xenobiótico, como en la eliminación de hidroperóxidos; mientras que las isoformas *GSTO* y *GSTZ* están asociadas a la resistencia al estrés oxidativo y transformación de ácidos, respectivamente (Townsend 2007; Uhlén et al. 2015). Las GST también tienen funciones no enzimáticas, ya que participan en la regulación de vías de señalización celular (Ściskalska y Milnerowicz 2020). Las enzimas *GSTP* y *GSTM* participan en la regulación de la vía de la MAP quinasa al interactuar con proteínas involucradas en la supervivencia y muerte celular (Townsend y Tew 2003). Jacobs et al. (2018) encontraron que la exposición a MEHP en embriones de pez cebra causa efectos perjudiciales sobre los niveles de *GSTP*, lo que es consistente con la disminución de la expresión de *GSTP1* encontrada en el presente estudio. En células epiteliales bronquiales humanas, la hipermetilación de ADN y la supervivencia celular se asociaron con la inhibición de la expresión génica de *OGG1* y *GSTP1* (Wang, Wang, et al. 2021). La mayor actividad de GST y el aumento en los niveles de transcripción de *GSTM1*, *GSTK1*, *MGST*, *GSTO1* y *GSTZ1* observados en el presente estudio sugieren que la exposición a DEHP activa los procesos de desintoxicación de fase II, y potencialmente la vía MAP quinasa, en células del músculo esquelético humano.

Al finalizar los bioensayos (13 días), los niveles de transcripción de *NRF2* disminuyeron en células del músculo esquelético de humano expuestas a DEHP, con respecto al control ($p < 0.05$). Lo contrario fue observado para las células del músculo esquelético del lobo marino de California, en las cuales los niveles de transcripción de *NRF2* fueron mayores en los cultivos expuestos al xenobiótico ($p < 0.05$). Los resultados de este estudio sugieren que la subexpresión de *NRF2* potencialmente tiene un efecto en la reducción de las defensas antioxidantes de las células de músculo esquelético de humano expuestas a DEHP. La inhibición de la vía *NRF2* puede interrumpir la síntesis de defensas antioxidantes y de desintoxicación, como la síntesis *de novo* de GSH por la glutamato-cisteína ligasa (GCLC) (Harvey et al. 2009; Wu et al. 2013; Amara et al. 2020). Un decremento en la disponibilidad de GSH aumentan la susceptibilidad al estrés oxidativo y afecta las vías de desintoxicación, ya que enzimas como la GR, GPx y GST dependen de GSH para su reciclamiento o conjugación con xenobióticos (Harvey et al. 2009; Kim, Jung, et al. 2010; Mejia-Sanchez et al. 2018). En lobo marino de California, el aumento en la expresión

de NRF2 podría estar relacionado al incremento observado en la actividad antioxidante de SOD, CAT y GPx, contribuyendo a una defensa antioxidante efectiva.

El nivel de transcripción de ARNm de *OGG1* fue significativamente mayor en las células de músculo esquelético del lobo marino de California expuestas a DEHP que en las células mantenidas en condiciones control ($p < 0.05$). En contraste, en las células de músculo esquelético de humano expuestas a DEHP la expresión de *OGG1* fue significativamente menor que en aquellas mantenidas bajo condiciones control ($p < 0.05$). La enzima OGG1 es responsable de reparar el daño oxidativo del ADN, al eliminar las bases oxidadas como la 8-oxoguanina (8-oxoG) (D'Augustin et al. 2023). La disminución de la expresión del gen *OGG1* en respuesta a DEHP podría promover la metilación oxidativa del ADN (Lu et al. 2021), aumentar la inestabilidad genómica (Zhou et al. 2016), alterar la respuesta al estrés oxidativo (Ba et al. 2014; Ba y Boldogh 2018), inducir malformaciones celulares y disminuir la proliferación celular (Gu et al. 2013) en células musculares de humano. El DEHP tiene efectos genotóxicos sobre *OGG1* en larvas de pez cebra (*Danio rerio*, *in vivo*) y células humanas embrionarias de riñón (HEK293T, *in vitro*) (Lu et al. 2021). Por otra parte, el aumento de la producción de especies reactivas y la acumulación de 8-oxoG conducen a una inactivación transitoria de *OGG1* en células humanas (linfoma, alveolares y epiteliales de riñón) (Jamaluddin et al. 2007; Pan et al. 2016). OGG1 podría inhibirse por la oxidación de residuos de cisteína, lo que perjudica su capacidad para reparar el daño del ADN (Wang, Maayah, et al. 2021) o por la acumulación de 8-oxoG, que interfiere con la unión de OGG1 al ADN (Pan et al. 2016). La inactivación de *OGG1* también podría aumentar los niveles de mRNA de genes proinflamatorios (Ba et al. 2014; Ba y Boldogh 2018). Los resultados del presente estudio sugieren que las células del músculo esquelético de humanos expuestas a DEHP son susceptibles a alteraciones morfológicas, menor proliferación, daño y estrés oxidativo, así como inestabilidad genómica, las células del lobo marino de California tienen mecanismos eficientes de reparación del ADN que contribuyen a evitar el daño y estrés oxidativo.

En las muestras de humano, los niveles de expresión de la *IL-6* fueron mayores en células musculares esqueléticas expuestas a DEHP (1 mM) en comparación con las células mantenidas

en condiciones control ($p < 0.05$). En células musculares de lobo marino de California expuestas a DEHP, la expresión de *IL-6* fue significativamente menor, mientras que la expresión de *IL-15* fue significativamente mayor ($p < 0.05$), en comparación con aquellas mantenidas bajo condiciones control. El aumento en los niveles de carbonilos proteicos en las células musculares de humano expuestas a DEHP podría haber afectado la expresión de *IL-6*, lo que podría contribuir a las alteraciones morfológicas y reducción de la proliferación celular observadas en esta especie. Si bien los niveles bajos de *IL-6* promueven la activación de células satélite y la regeneración de miotubos, la sobreexpresión de este gen se ha relacionado a procesos de atrofia de células de músculo esquelético (Haddad et al. 2005; Belizário et al. 2016). Un aumento en los niveles de carbonilos proteicos puede promover la activación de mediadores inflamatorios como *IL-6* (Saha et al. 2020; Estévez et al. 2022). *In vivo*, la degeneración muscular puede darse tanto de manera natural por la edad, como ser inducida por la exposición a contaminantes (Fulle et al. 2004; Sullivan-Gunn y Lewandowski 2013; Yang et al. 2022). Recientemente se ha reportado una relación entre la prevalencia de sarcopenia, enfermedad degenerativa del músculo, y la exposición a ftalatos (análisis de metabolitos en orina) en humanos adultos (Yang et al. 2022). La sarcopenia por envejecimiento se acompaña de una reducción en la masa muscular, niveles elevados de H_2O_2 y una baja actividad de las enzimas CAT y GPx (Sullivan-Gunn y Lewandowski 2013). Los resultados de nuestro estudio en humanos muestran una reducción en la viabilidad celular, un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$, la actividad de SOD, niveles de carbonilos proteicos, expresión de *IL-6* y una disminución en la expresión génica de *OGG1* y *NRF2*, por lo que se sugiere que la exposición a DEHP en cultivos primarios pudiera participar en procesos degenerativos de células musculares humanas, similares a la sarcopenia. En lobo marino de California, la sobreexpresión de *IL-15* ($p < 0.05$), gen asociado a la regeneración muscular (Nielsen et al. 2007), corresponde con la respuesta de las células musculares de esta especie, dirigida a la remoción de especies reactivas, activación de mecanismos de reparación y mantenimiento de la viabilidad celular del 79%. Asimismo, la sobreexpresión de *IL-15* confirma los hallazgos de otros autores sobre la mayor capacidad antioxidante de los tejidos de diversas especies de mamíferos marinos con respecto a especies terrestres (Vázquez-Medina et al. 2006, 2012; Cantú-Medellín et al. 2011; Zenteno-Savín et al. 2011; Allen et al. 2019).

Las diferentes respuestas entre las células del músculo esquelético del lobo marino de California y las humanas expuestas a DEHP (1 mM, 13 días) resaltan la eficacia del sistema de defensa antioxidante en los tejidos de mamíferos marinos, en los cuales el aumento de la producción de radical superóxido no induce necesariamente daño oxidativo ni altera toda la red antioxidante, lo que complementa la literatura existente sobre la preparación que tienen ciertas especies ante los retos del estrés oxidativo (Hermes-Lima y Storey 1993; Hermes-Lima et al. 1998, 2015; Giraud-Billoud et al. 2019). La respuesta diferencial a la exposición a DEHP entre especies (humanos y lobos marinos) sugiere que las adaptaciones fisiológicas, específicamente las defensas antioxidantes elevadas, observadas en los mamíferos buceadores para proteger sus tejidos del daño oxidativo derivado de los ciclos de isquemia/reperfusión (Zenteno-Savín et al. 2011), podrían permitirles hacer frente a otros factores estresantes que inducen estrés oxidativo, como los ftalatos y, potencialmente, otros contaminantes. Se requieren estudios adicionales para evaluar estas respuestas *in vivo*.

8.4 Evaluación del índice de respuesta de biomarcadores integrado (IBR) en respuesta a la exposición a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

Se utilizó la respuesta antioxidante, producción de $O_2^{\bullet-}$, niveles de TBARS y carbonilos proteicos y expresión de genes relacionados al estrés oxidativo como biomarcadores de la exposición a ftalatos en cultivos primarios de músculo esquelético de humano y lobo marino de California. En humanos, los valores más altos de IBR en cultivos con DEHP fueron $O_2^{\bullet-}$, TBARS, carbonilos proteicos, SOD y GST; mientras que en lobo marino de California los valores más altos de IBR fueron dados por las variables $O_2^{\bullet-}$, TBARS, carbonilos proteicos, SOD, CAT, GPx y GST. Valores altos de IBR (mayor área en el gráfico) indican que un tratamiento utilizado, en el presente estudio la exposición a DEHP, se relaciona a un efecto tóxico mayor de un agente sobre las variables de interés (Baihetiyaer et al. 2023). En ambas especies, los indicadores de actividad enzimática, producción de $O_2^{\bullet-}$ y niveles de daño oxidativo mostraron valores más elevados de IBR dentro de los cultivos tratados con DEHP (1 mM). Por otra parte, los valores de IBR obtenidos a partir de las variables de expresión génica fueron más altos dentro de los controles en comparación con los cultivos expuestos a DEHP para ambas especies. Esto nos habla de

diferencias en biomarcadores moleculares entre especies y entre tratamientos. A partir de nuestros resultados se sugiere que los biomarcadores que muestran mayor susceptibilidad a ser inhibidos podrían estarse reportando como valores bajos dentro de este índice, a pesar de que los efectos en las muestras de interés sean adversos.

8.5 Comparación de la respuesta entre especies

En los cultivos de células musculares de humano y lobo marino de California mantenidos bajo condiciones control, la actividad de SOD, producción de radical superóxido y niveles de carbonilos proteicos fueron las variables que permitieron distinguir entre especies. Por otra parte, únicamente la actividad de SOD y niveles de carbonilos proteicos fueron las variables que ayudan a diferenciar entre especies en los cultivos expuestos a DEHP (1 mM). Las diferencias entre especies presentadas en los grupos control y exposición a DEHP podrían deberse a niveles de antioxidantes endógenos más altos en mamíferos marinos (Cantú-Medellín et al. 2011; Vázquez-Medina et al. 2012), bajos niveles basales (condiciones control) de producción de especies reactivas en especies con mayor tasa metabólica (Salin et al. 2015), así como la capacidad para evitar o reparar el daño oxidativo a macromoléculas (Vázquez-Medina et al. 2011; Allen y Vázquez-Medina 2019). En el presente estudio, el poder discriminante del ADL sugiere que es posible diferenciar la respuesta de cultivos celulares primarios de músculo esquelético de humano y de lobo marino de California y entre condiciones de cultivo control y exposición al plastificante DEHP en ambas especies.

El presente estudio revela la importancia del músculo esquelético dentro de los procesos de biotransformación del DEHP. Por lo anterior, se sugiere hacer más estudios *in vitro* e *in vivo* para clarificar los mecanismos y vías específicas que conllevan a los efectos de DEHP en distintos tipos celulares y especies. Asimismo, los resultados del presente estudio sugieren que la exposición crónica al DEHP reduce la capacidad de proliferación de las células humanas del músculo esquelético, reduciendo la tasa de crecimiento hasta que la viabilidad celular no puede ser mantenida. Estos resultados revelan los efectos de la exposición a DEHP sobre la funcionalidad de las células musculares y la salud humana. Además, contribuye a clarificar los

efectos tóxicos de los ftalatos en tejidos con tasa metabólica elevada, como el músculo esquelético, el cual además representa un de los órganos con mayor superficie del cuerpo humano (Janssen et al. 2000; Hill y Olson 2012). Finalmente, la posibilidad de cultivar células musculares primarias de mamíferos marinos abre nuevas vías para el estudio de las adaptaciones metabólicas de estas especies ante el estrés oxidante inducido por agentes xenobióticos.

9. CONCLUSIONES

- La exposición a DEHP (1 mM) durante 13 días produce cambios en la morfología del músculo esquelético de humano y lobo marino de California, incluyendo alteraciones en las membranas celular y nuclear, pérdida de volumen y producción de cuerpos de estrés.
- La exposición a DEHP disminuyó la viabilidad celular y tasa de proliferación celular en ambas especies.
- El DEHP incrementó el daño oxidativo a proteínas e indujo la activación de la fase II de detoxificación en células de músculo esquelético de humano.
- El DEHP incrementó las defensas antioxidantes en células de músculo esquelético de lobo marino de California, lo que potencialmente contribuyó a evitar el daño oxidativo.
- La exposición a DEHP aumentó la expresión de *OGG1* en células musculares de lobo marino de California, induciendo la reparación del daño oxidativo al ADN.
- Luego de 13 días de exposición, el DEHP incrementó la expresión de *IL-15* en lobo marino de California e *IL-6* en humano, sugiriendo la activación de vías de proliferación celular y degeneración muscular, respectivamente.
- En humanos, se observaron diferencias significativas en la actividad catalítica de la GST, enzima que participa en los procesos de conjugación del DEHP.
- En general, la exposición crónica a DEHP reduce la capacidad de proliferación y viabilidad de las células musculares de mamíferos. Los resultados de humano sugieren que el DEHP puede tener efectos tóxicos en tejidos con tasa metabólica elevada, como el músculo esquelético. La posibilidad de cultivar células musculares primarias de mamíferos marinos abre nuevas vías para el estudio de los efectos de los xenobióticos en estas especies.

10. LITERATURA CITADA

- Abreu, P. y Kowaltowski, A.J. (2020). Satellite cell self-renewal in endurance exercise is mediated by inhibition of mitochondrial oxygen consumption. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11: 1661-1676.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. En: *Methods in enzymology*. Elsevier, New York, United States, pp. 121-126.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2019). *Toxicological profile for di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)*. Life Systems, Atlanta, Georgia, United States.
- Ahmad, I., Pacheco, M. y Santos, M.A. (2006). *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an *in situ* study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*, 65: 952-962.
- Alarcin, E., Bal-Öztürk, A., Avci, H., Ghorbanpoor, H., Dogan Guzel, F., Akpek, A., Yesiltas, G., Canak-Ipek, T. y Avci-Adali, M. (2021). Current strategies for the regeneration of skeletal muscle tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 5929.
- Alberts, B. (2013). *Essential cell biology*. 4th ed. Garland Science, New York, United States.
- Albro, P.W., Corbett, J.T., Schroeder, J.L., Jordan, S. y Matthews, H.B. (1982). Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environmental Health Perspectives*, 45: 19-25.
- Alimba, C.G. y Faggio, C. (2019). Microplastics in the marine environment: current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68: 61-74.
- Allen, K.N. y Vázquez-Medina, J.P. (2019). Natural tolerance to ischemia and hypoxemia in diving mammals: A Review. *Frontiers in Physiology*, 10: 1-10.
- Allen, K.N., Vázquez-Medina, J.P., Lawler, J.M., Mellish, J.-A.E., Horning, M. y Hindle, A.G. (2019). Muscular apoptosis but not oxidative stress increases with old age in a long-lived diver, the Weddell seal. *Journal of Experimental Biology*, 222(12): jeb200246.
- Al-Saleh, I., Coskun, S., Al-Doush, I., Al-Rajudi, T., Al-Rouqi, R., Abduljabbar, M. y Al-Hassan, S. (2019). Exposure to phthalates in couples undergoing in vitro fertilization treatment and its association with oxidative stress and DNA damage. *Environmental Research*, 169: 396-408.
- Alway, S.E., Paez, H.G. y Pitzer, C.R. (2023). The role of mitochondria in mediation of skeletal muscle repair. *Muscles*, 2: 119-163.
- Amara, I., Salah, A., Timoumi, R., Annabi, E., Scuto, M., Trovato, A., Neffati, F., Calabrese, V. y Abid-Essefi, S. (2020). Effect of di(2-ethylhexyl) phthalate on Nrf2-regulated glutathione homeostasis in mouse kidney. *Cell Stress and Chaperones*, 25: 919-928.
- Amato, K.R., Yeoman, C.J., Kent, A., Righini, N., Carbonero, F., Estrada, A., Rex Gaskins, H., Stumpf, R. M., Yildirim, S., Torralba, M., Gillis, M., Wilson, B. A., Nelson, K. E., White, B. A. y Leigh, S. R. (2013). Habitat degradation impacts black howler monkey (*Alouatta pigra*) gastrointestinal microbiomes. *The ISME Journal*, 7: 1344-1353.
- Amiard-Triquet, C. y Amiard, J.C. (2012). Behavioral ecotoxicology. En: *Ecological biomarkers: Indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press, Florida, United States, pp. 253-278.
- Ba, X., Bacsi, A., Luo, J., Aguilera-Aguirre, L., Zeng, X., Radak, Z., Brasier, A.R. y Boldogh, I. (2014). 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating

- the recruitment of site-specific transcription factors. *The Journal of Immunology*, 192: 2384-2394.
- Ba, X. y Boldogh, I. (2018). 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biology*, 14: 669-678.
- Baihetiyaer, B., Jiang, N., Li, X., He, B., Wang, J., Fan, X., Sun, H. y Yin, X. (2023). Oxidative stress and gene expression induced by biodegradable microplastics and imidacloprid in earthworms (*Eisenia fetida*) at environmentally relevant concentrations. *Environmental Pollution*, 323: 121285.
- Baldwin, W.S. (2019). Phase 0 of the xenobiotic response: nuclear receptors and other transcription factors as a first step in protection from xenobiotics. *Nuclear Receptor Research*, 6: 1-17.
- Balk, L., Hylland, K., Hansson, T., Berntssen, M.H.G., Beyer, J., Jonsson, G., Melbye, A., Grung, M., Torstensen, B. E., Børseth, J. F., Skarphedinsdottir, H. y Klungsøyr, J. (2011). Biomarkers in natural fish populations indicate adverse biological effects of offshore oil. *PLoS ONE*, 6: e19735.
- Banci, L., Barbieri, L., Bertini, I., Luchinat, E., Secci, E., Zhao, Y. y Aricescu, A.R. (2013). Atomic-resolution monitoring of protein maturation in live human cells by NMR. *Nature Chemical Biology*, 9: 297-299.
- Barbieri, E. y Sestili, P. (2012). Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *Journal of Signal Transduction*, 2012: 1-17.
- Barbosa, A.M., Real, R. y Mario Vargas, J. (2009). Transferability of environmental favourability models in geographic space: The case of the Iberian desman (*Galemys pyrenaicus*) in Portugal and Spain. *Ecological Modelling*, 220: 747-754.
- Barsan, M.E. (2007). *NIOSH pocket guide to chemical hazards*. 3rd ed. Department of Health and Human Services, Cincinnati, United States.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. y Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1): 1-48.
- Beckendorf, L. y Linke, W.A. (2015). Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 36: 25-36.
- Beckman, K.B. y Ames, B.N. (1999). Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutation Research*, 424: 51-58.
- Beliaeff, B. yBurgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 1316-1322.
- Belizário, J.E., Fontes-Oliveira, C.C., Borges, J.P., Kashiabara, J.A. y Vannier, E. (2016). Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. *SpringerPlus*, 5: 604-619.
- Bernard, L., Bouattour, Y., Masse, M., Boeuf, B., Decaudin, B., Genay, S., Lambert, C., Moreau, E., Pereira, B., Pinguet, J., Richard, D. y Sautou, V. (2021). Association between urinary metabolites and the exposure of intensive care newborns to plasticizers of medical devices used for their care management. *Metabolites*, 11(4): 236-252.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B. Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L. y Lander, E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125: 315-326.

- Berta, A., Sumich, J. y Kovacs, K. (2015). *Marine Mammals*. 3rd ed. Academic Press, California, Unites States.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69: 89-95.
- Blazer, V.S., Iwanowicz, L.R., Henderson, H., Mazik, P.M., Jenkins, J.A., Alvarez, D.A. y Young, J.A. (2012). Reproductive endocrine disruption in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) in the Potomac River basin: spatial and temporal comparisons of biological effects. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184: 4309-4334.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brassea-Pérez, E., Hernández-Camacho, C.J., Labrada-Martagón, V., Vázquez-Medina, J.P., Gaxiola-Robles, R. y Zenteno-Savín, T. (2022). Oxidative stress induced by phthalates in mammals: State of the art and potential biomarkers. *Environmental Research*, 206: 112636.
- Brun, C.E., Chevalier, F.P., Dumont, N.A. y Rudnicki, M.A. (2017). The satellite cell niche in skeletal muscle. En: *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*. Elsevier, San Diego, California, United States, pp. 145-166.
- Bustamante-Montes, L.P., Lizama-Soberanis, B., Vázquez-Moreno, F., García-Fábila, M.M., Corea-Téllez, K.S., Olaiz-Fernández, G. y Borja-Aburto, V.H. (2004). Infant exposure to potentially toxic plasticizers in products for oral use. *Salud Pública de México*, 46: 501-508.
- Calderon, A., Aspajo Villalaz, C. y Pretel-Sevillano, O. (2020). Estrés oxidativo y especies reactivas. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 38: 53-65.
- Cantú-Medellín, N., Byrd, B., Hohn, A., Vázquez-Medina, J.P. y Zenteno-Savín, T. (2011). Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158: 438-443.
- Carl Zeiss Microscopy GmbH. (2011). Software Guide ZEN 2. Available in: https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/files/3914/3765/2064/ZEN_2_blue_edition_-_Software_Guide.pdf [consultado: 3 marzo 2020].
- Castellini, M.A. (1991). The biology of diving mammals: behavioral, physiological, and biochemical limits. In: *Advances in comparative and environmental physiology*. Springer, Berlin, Germany, pp. 105-134.
- Castillo-Castañeda, P.C., Gaxiola-Robles, R., Labrada-Martagón, V., Acosta Vargas, B., Méndez-Rodríguez, L.C. y Zenteno-Savín, T. (2017). Oxidative damage to proteins related to metals and antioxidant defenses in breastmilk. *Nutrición Hospitalaria*, 34: 59-64.
- Chang, W.H., Tsai, Y.S., Wang, J.Y., Chen, H.L., Yang, W.-H., Lee, C.-C. (2019). Sex hormones and oxidative stress mediated phthalate-induced effects in prostatic enlargement. *Environment International*, 126: 184-192.
- Chen, S.S., Hung, H.T., Chen, T.J., Hung, H.S. y Wang, D.C. (2013). Di-(2-ethylhexyl)-phthalate reduces MyoD and myogenin expression and inhibits myogenic differentiation in C2C12 cells. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38: 783-791.
- Chen, Y., Li, C., Song, P., Yan, B., Yang, X., Wu, Y. y Ma, P. (2019). Hepatic and renal tissue damage in Balb/c mice exposed to diisodecyl phthalate: The role of oxidative stress pathways. *Food and Chemical Toxicology* 132: 110600.

- Chen, Y.H., Wu, Y.J., Chen, W.C., Lee, T.S., Tsou, T.C., Chang, H.C., Lo, S.W. y Chen, S.L. (2020). MEHP interferes with mitochondrial functions and homeostasis in skeletal muscle cells. *Bioscience Reports*, 40: BSR20194404.
- Cho, Y.J., Park, S.B. y Han, M. (2015). Di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces oxidative stress in human endometrial stromal cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 407: 9-17.
- Choi, W., Lee, J.W., Huh, M.-H. y Kang, S.-H. (2003). An algorithm for computing the exact distribution of the Kruskal–Wallis Test. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 32: 1029-1040.
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Lawrence Erlbaum Associates, New Jersey, United States.
- Connon, R.E., D’Abronzio, L.S., Hostetter, N.J., Javidmehr, A., Roby, D.D., Evans, A.F., Loge, Frank, J. y Werner, I. (2012). Transcription profiling in environmental diagnostics: health assessments in Columbia river basin steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science & Technology*, 46: 6081-6087.
- Correll, J., Mellinger, C., McClelland, G.H. y Judd, C.M. (2020). Avoid Cohen’s ‘small’, ‘medium’, and ‘large’ for power analysis. *Trends in Cognitive Sciences*, 24: 200-207.
- Crapo, J.D., Oury, T., Rabouille, C., Slot, J.W. y Chang, L.Y. (1992). Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 10405-10409.
- Curtis, J.M., Hahn, W.S., Long, E.K., Burrill, J.S., Arriaga, E.A. y Bernlohr, D.A. (2012). Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23: 399-406.
- Daniel, W.W. y Cross, C.L. (2014). *Biostatistics: basic concepts and methodology for the health sciences*. 10th ed. Wiley, Singapore.
- Das, M.T., Kumar, S.S., Ghosh, P., Shah, G., Malyan, S.K., Bajar, S., Thakur, I.S. y Singh, L. (2021). Remediation strategies for mitigation of phthalate pollution: Challenges and future perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 409: 124496.
- D’Augustin, O., Gaudon, V., Siberchicot, C., Smith, R., Chapuis, C., Depagne, J., Veaute, X., Busso, D., Di Guilmi, A. M., Castaing, B., Radicella, J. P., Campalans, A y Huet, S. (2023). Identification of key residues of the DNA glycosylase OGG1 controlling efficient DNA sampling and recruitment to oxidized bases in living cells. *Nucleic Acids Research*, 51: 4942-4958.
- Decuyper, J.-P., Monaco, G., Bultynck, G., Missiaen, L., De Smedt, H. y Parys, J.B. (2011). The IP3 receptor–mitochondria connection in apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813: 1003-1013.
- Del Águila-Vargas, A.C., Vázquez-Medina, J.P., Crocker, D.E., Méndez-Rodríguez, L.C., Gaxiola-Robles, R., de Anda-Montañez, J.A., Ramírez-Jirano, L.J., Lugo-Lugo, O. y Zenteno-Savín, T. (2020). Antioxidant response to cadmium exposure in primary skeletal muscle cells isolated from humans and elephant seals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 227: 108641.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L. y Pain-Devin, S. (2014). The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research*, 21: 2448-2454.

- DOF. (2003). *Norma Oficial Mexicana, NOM-087-ECOL-SSA1-2002, sobre protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológico-infecciosos y clasificación y especificaciones de manejo*. Diario Oficial, Ciudad de México, México [17 febrero 2003].
- Dong, R., Chen, J., Zheng, J., Zhang, M., Zhang, H., Wu, M., Li, S. y Chen, B. (2018). The role of oxidative stress in cardiometabolic risk related to phthalate exposure in elderly diabetic patients from Shanghai. *Environment International*, 121: 340-348.
- Dueweke, J.J., Awan, T.M. y Mendias, C.L. (2017). Regeneration of skeletal muscle after eccentric injury. *Journal of Sport Rehabilitation*, 26: 171-179.
- Dziobak, M.K., Wells, R.S., Pisarski, E.C., Wirth, E.F. y Hart, L.B. (2021). Demographic assessment of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and monoethyl phthalate (MEP) concentrations in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, FL, USA. *GeoHealth*, 5: e2020GH000348.
- Edge, K.J., Johnston, E.L., Roach, A.C. y Ringwood, A.H. (2012). Indicators of environmental stress: cellular biomarkers and reproductive responses in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*). *Ecotoxicology*, 21: 1415-1425.
- Efron, B. y Tibshirani, R. (1993). *An introduction to the bootstrap*. Chapman & Hall, New York, United States.
- Ehrlich, P. (1904). Farben-therapeutische versuche bei trypanosomen erkrankung. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 14: 362-365.
- Elcombe, C.R. y Mitchell, A.M. (1986). Peroxisome proliferation due to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): species differences and possible mechanisms. *Environmental Health Perspectives*, 70: 211-219.
- Ellis, P.D. (2010). *The Essential Guide to Effect Sizes: Statistical Power, Meta-Analysis, and the Interpretation of Research Results*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Elsner, R., Gooden, B. (1983). *Diving and asphyxia: a comparative study of animals and man*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Environmental Protection Agency (EPA). (1989). *Statistical analysis of ground-water monitoring data at RCRA facilities : interim final guidance*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste, Waste Management Division, Washington, D.C.
- Estévez, M., Díaz-Velasco, S. y Martínez, R. (2022). Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update. *Amino Acids*, 54: 559-573.
- Fang, E.F., Scheibye-Knudsen, M., Chua, K.F., Mattson, M.P., Croteau, D.L. y Bohr, V.A. (2016). Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17: 308-321.
- Ferguson, K.K., Chen, Y.-H., VanderWeele, T.J., McElrath, T.F., Meeker, J.D. y Mukherjee, B. (2017). Mediation of the relationship between maternal phthalate exposure and preterm birth by oxidative stress with Repeated Measurements across Pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 125: 488-494.
- Ferguson, K.K., Loch-Caruso, R. y Meeker, J.D. (2011). Urinary phthalate metabolites in relation to biomarkers of inflammation and oxidative stress: NHANES 1999-2006. *Environmental Research*, 111: 718-726.
- Fernandes, B.L., Maria, F., Nakao, L.S., Ingberman, M. y Cubas, M.R. (2018). Determination of Di(2-ethylhexyl phthalate) released in the blood from PVC line during the hemodialysis procedure. *Matéria*, 23(1): 1-10.

- Ferson, S. y Burgman, M.A. (2000). *Quantitative methods for conservation biology*. Springer, New York, United States.
- Flohé, L. y Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. En *Methods in Enzymology: Oxygen radicals in biological systems*. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 114-120.
- Food and Drug Administration, HHS. (2008). International conference on harmonisation; guidance on e15 pharmacogenomics definitions and sample coding; availability. notice. *Federal Register*, 73: 19074-19076.
- Fossi, M. (2019). *Marine mammal ecotoxicology*. Elsevier, Waltham, Massachusetts, United States.
- Fossi, M.C., Marsili, L., Baini, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., Caliani, I., Minutoli, R., Lauriano, G., Finoia, M. G., Rubegni, F., Panigada, S., Bérubé, M., Urbán-Ramírez, J. y Panti, C. (2016). Fin whales and microplastics: the Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environmental Pollution*, 209: 68-78.
- Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L. y Minutoli, R. (2012). Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Marine Pollution Bulletin*, 64: 2374-2379.
- Franken, C., Lambrechts, N., Govarts, E., Koppen, G., Den Hond, E., Ooms, D., Voorspoels, S., Bruckers, L., Loots, I., Nelen, V., Sioen, I., Nawrot, T. S., Baeyens, W., Van Larebeke, N. y Schoeters, G. (2017). Phthalate-induced oxidative stress and association with asthma-related airway inflammation in adolescents. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220: 468-477.
- Franklin, M.R. (2015). Xenobiotic absorption, distribution, metabolism, and excretion. En *Principles of Toxicology: environmental and industrial applications*. Wiley, New York, United States, pp. 499.
- Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E. y Andersson, A.M. (2007). Metabolism of phthalates in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 899-911.
- Freshney, R.I. (2016). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 7th ed. John Wiley & Sons, New Jersey, United States.
- Fromme, H. (2011). Phthalates: Human Exposure. En Nriagu, J. O. (ed.), *Encyclopedia of environmental health*. Elsevier, Burlington, Vermont, United States, pp. 498-510.
- Fukai, T. (2002). Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 55: 239-249.
- Fulle, S., Protasi, F., Di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., Vecchiet, L. y Fanò, G. (2004). The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Experimental Gerontology*, 39: 17-24.
- Garattini, S. (1983). Notes on xenobiotic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 407: 1-25.
- García-Fabila, M.M., Chávez, A.A., Meza, J.C.S., Montes, L.P.B. y García, A.R. (2020). Phthalates in the diet of Mexican children of school age: risk analysis. *Toxicology Reports*, 7: 1487-1494.
- Giordani, L., He, G.J., Negroni, E., Sakai, H., Law, J.Y.C., Siu, M.M., Wan y R. et al. (2019). High-dimensional single-cell cartography reveals novel skeletal muscle-resident cell populations. *Molecular Cell*, 74: 609-621.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P. y Rizzuto, R. (2008). Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Current Molecular Medicine*, 8: 119-130.

- Giovani, G., Filippi, S., Molino, C., Peruffo, A., Centelleghe, C., Meschini, R. y Angeletti, D. (2022). Plastic additive di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) causes cell death and micronucleus induction on a bottlenose dolphin's (*Tursiops truncatus*) *in vitro*-exposed skin cell line. *Frontiers in Marine Science*, 9: 958197.
- Giraud-Billoud, M., Rivera-Ingraham, G.A., Moreira, D.C., Burmester, T., Castro-Vazquez, A., Carvajalino-Fernández, J.M., Dafre, A., Niu, C., Tremblay, N., Paital, B., Rosa, R., Storey, J. M., Vega, I. A., Zhang, W., Yepiz-Plascencia, G., Zenteno-Savín, T., Storey, K. B. y Hermes-Lima, M. (2019). Twenty years of the 'Preparation for Oxidative Stress' (POS) theory: ecophysiological advantages and molecular strategies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 234: 36-49.
- Girón-Pérez, M.I., Romero-Bañuelos, C.A., Toledo-Ibarra, G.A., Rojas-García, A.E., Medina-Díaz, I.M., Robledo-Marenco, M.L. y Vega-López, A. (2013). Evaluation of pollution in Camichin estuary (Mexico): pro-oxidant and antioxidant response in oyster (*Crassostrea corteziensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165: 476-482.
- Gobas, F.A.P.C., Mackintosh, C.E., Webster, G., Ikonomou, M., Parkerton, T.F. y Robillard, K. (2003). Bioaccumulation of phthalate esters in aquatic food-webs. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 3: 201-225.
- Goldberg, D.M. y Spooner, R.J. (1987). Assay of Glutathione Reductase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 258-265.
- Goll, V., Alexandre, E., Viollon-Abadie, C., Nicod, L., Jaeck, D. y Richert, L. (1999). Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, dna synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160: 21-32.
- Gomez-Quiroz, L., Simoni, A., Salas Silva, S. y Miranda, R. (2017). Fundamentos de la señalización redox: lecciones de los sistemas generadores de especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico*, 41: 108-115.
- Greene, N.P., Lee, D.E., Brown, J.L., Rosa, M.E., Brown, L.A., Perry, R.A., Henry, J.N. y Washington, T.A. (2015). Mitochondrial quality control, promoted by PGC-1 α , is dysregulated by Western diet-induced obesity and partially restored by moderate physical activity in mice. *Physiological Reports*, 3: e12470.
- Grubbs, F.E. (1950). Sample criteria for testing outlying observations. *The Annals of Mathematical Statistics*, 21: 27-58.
- Gu, A., Ji, G., Yan, L. y Zhou, Y. (2013). The 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) decreases the vulnerability of the developing brain to DNA damage. *DNA Repair*, 12: 1094-1104.
- Guo, B.-C., Kuo, K.-L., Huang, J.-W., Chen, C.-H., Tarng, D.-C. y Lee, T.-S. (2023). Di-(2-ethylhexyl) phthalate limits the lipid-lowering effects of simvastatin by promoting protein degradation of low-density lipoprotein receptor: role of PPAR γ -PCSK9 and LXR α -IDOL signaling pathways. *Antioxidants*, 12(2): 477-492.
- Guo, Y., Weck, J., Sundaram, R., Goldstone, A.E., Louis, G.B. y Kannan, K. (2014). Urinary concentrations of phthalates in couples planning pregnancy and its association with 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative stress: longitudinal investigation of fertility and the environment study. *Environmental Science & Technology*, 48: 9804-9811.

- Gurdemir, G., Erkekoglu, P., Balci, A., Sur, U., Ozkemahli, G., Tutkun, E., Yilmaz, H., Asci, A. y Kocer-Gumusel, B. (2019). Oxidative stress parameters, selenium levels, DNA damage, and phthalate levels in plastic workers. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 38: 253-270.
- Habig, W. y Jakoby, H.B. (1981). Glutathione S-transferases (rat and human). En *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orlando, Florida, United States, pp. 218-234.
- Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D.M. y Adams, G.R. (2005). IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 98: 911-917.
- Haff, L.A. (1994). Improved quantitative PCR using nested primers. *Genome Research*, 3: 332-337.
- Häggmark, T. y Thorstensson, A. (1979). Fibre types in human abdominal muscles. *Acta Physiologica Scandinavica*, 107: 319-325.
- Haishima, Y., Kawakami, T., Hasegawa, C., Tanoue, A., Yuba, T., Isama, K., Matsuoka, A. y Niimi, S. (2014). Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride: alternative plasticizer effective in hemolysis suppression. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102: 721-728.
- Hall, P. y Presnell, B. (1999). Biased Bootstrap methods for reducing the effects of contamination (1998). *Journal of the Royal Statistical Society*, 61: 661-680.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, New York, USA.
- Handayani, D., Notodiputro, K.A., Sadik, K. y Kurnia, A. (2017). A comparative study of approximation methods for maximum likelihood estimation in generalized linear mixed models (GLMM). *AIP Conference Proceedings*, 1827: 1-9.
- Hara, M. (1993). *Polyelectrolytes: science and technology*. Marcel Dekker, New York, United States.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11: 298-300.
- Harr, M.W. y Distelhorst, C.W. (2010). Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals that Mediate Life or Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2: a005579-a005579.
- Hart, L.B., Dziobak, M.K., Pisanski, E.C., Wirth, E.F. y Wells, R.S. (2020). Sentinels of synthetics: a comparison of phthalate exposure between common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and human reference populations Li, S. *PLoS ONE*, 15: e0240506.
- Harvey, C.J., Thimmulappa, R.K., Singh, A., Blake, D.J., Ling, G., Wakabayashi, N., Fujii, J. y Biswal, A. M. (2009). Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 46: 443-453.
- Hawke, T.J. y Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*, 91: 534-551.
- Hector, A. (2015). *New statistics with R: an introduction for biologists*. Oxford University Press, Oxford ; New York, United States.
- Hermes-Lima, M., Moreira, D.C., Rivera-Ingraham, G.A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T.C. y Campos, É.G. (2015). Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 89: 1122-1143.

- Hermes-Lima, M., Storey, J.M. y, Storey, K.B. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120: 437-448.
- Hermes-Lima, M. y Storey, K.B. (1993). Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 265: R646-R652.
- Hernández-Almaraz, P., Lugo-Lugo, O., Gaxiola-Robles, R., Bitzer-Quintero, O.K., Ramírez-Jirano, L.J., Brassea-Pérez, E. y Zenteno-Savín, T. (2022). Morphological alterations in human skeletal muscle cells exposed to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in primary cell culture conditions. *International Journal of Morphology*, 40: 1209-1218.
- Herrero, O., Planelló, R., Gómez-Sande, P., Aquilino, M. y Morcillo, G. (2014). Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad. *Revista de Toxicología*, 31: 176-186.
- Hill, J.A. y Olson, E.N. (2012). *Muscle: fundamental biology and mechanisms of disease*. 1st ed. Academic Press, Waltham, Massachusetts, United States.
- Hill, R.W., Gordon, A.W. y Anderson, M. (2012). *Animal physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Massachusetts, USA.
- Hoelzel, A.R. (2002). *Marine mammal biology: an evolutionary approach*. Blackwell Pub, Oxford, England.
- Hollander, M. y Wolfe, D.A. (1973). *Nonparametric statistical methods*. Wiley, New York, United States.
- Holterman, C.E. y Rudnicki, M.A. (2005). Molecular regulation of satellite cell function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16: 575-584.
- Hong, Y. C., Park, E. Y., Park, M. S., Ko, J.A., Oh, S.Y., Kim, H., Lee, K.H., Leem, J.H. y Ha, E.H. (2009). Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population. *Toxicology Letters*, 184: 139-144.
- Hook, S.E., Gallagher, E.P. y Batley, G.E. (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health: biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10: 327-341.
- HSDB. (2008). Hazardous substances data bank. Available in: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/11933> [consulta: 16 de noviembre 2021].
- Huang, L., Zhu, X., Zhou, S., Cheng, Z., Shi, K., Zhang, C. y Shao, H. (2021). Phthalic acid esters: natural sources and biological activities. *Toxins*, 13(7): 495-512.
- Ighodaro, O. M. y Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54: 287-293.
- Jacobs, H.M., Sant, K.E., Basnet, A., Williams, L.M., Moss, J.B. y Timme-Laragy, A.R. (2018). Embryonic exposure to mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) disrupts pancreatic organogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 195: 498-507.
- Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B. y Brasier, A.R. (2007). TNF- α -induced NF- κ B/RelA Ser276 phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cellular Signalling*, 19: 1419-1433.
- Janssen, I., Heymsfield, S.B., Wang, Z. y Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *Journal of Applied Physiology*, 89: 81-88.

- Jarc, E. y Petan, T. (2019). Lipid droplets and the management of cellular stress. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 92: 435-452.
- Jezek, J., Cooper, K. y Strich, R. (2018). Reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: the yin and yang of mitochondrial dysfunction and cancer progression. *Antioxidants*, 7: 13-37.
- Ji, K., Lim Kho, Y., Park, Y. y Choi, K. (2010). Influence of a five-day vegetarian diet on urinary levels of antibiotics and phthalate metabolites: A pilot study with "Temple Stay" participants. *Environmental Research*, 110: 375-382.
- Johnson, L.L., Arkossh, M.R., Bravo, C.F., Collier, T.K., Krahn, W.L., Meador, J.P., Myers, M.S. y Stein, J.E. (2008). The effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons in the fish from Puget Sound, Washington. In: *The toxicology of fishes*. CRC Press, Florida, United States, pp. 877-923.
- Josephy, P. (2006). *Molecular Toxicology*. 2nd ed. Oxford University Press, New York, United States.
- Kabacoff, R. (2015). *R in action: data analysis and graphics with R*. 2nd ed. Manning Publications Co., New York, United States.
- Kalo, D., Hadas, R., Furman, O., Ben-Ari, J., Maor, Y., Patterson, D.G., Tomey, C. y Roth, Z. (2015). Carryover effects of acute DEHP exposure on ovarian function and oocyte developmental competence in lactating cows. *PLoS ONE*, 10: e0130896.
- Kanatous, S.B., DiMichele, L.V., Cowan, D.F. y Davis, R.W. (1999). High aerobic capacities in the skeletal muscles of pinnipeds: adaptations to diving hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 86: 1247-1256.
- Kanerva, M., Routti, H., Tamuz, Y., Nyman, M. y Nikinmaa, M. (2012). Antioxidative defense and oxidative stress in ringed seals (*Pusa hispida*) from differently polluted areas. *Aquatic Toxicology*, 114-115: 67-72.
- Karamanlidis, A.A., Lyamin, O., Adamantopoulou, S. y Dendrinou, P. (2017). First Observations of Aquatic Sleep in the Mediterranean Monk Seal (*Monachus monachus*). *Aquatic Mammals*, 43: 82-86.
- Kim, J.-H., Dahms, H.-U., Rhee, J.-S., Lee, Y.-M., Lee, J., Han, K.-N. y Lee, J.-S. (2010). Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151: 99-106.
- Kim, S., Kang, S., Lee, G., Lee, S., Jo, A., Kwak, K., Kim, D., Koh, D., Kho, Y.L., Kim, S. y Choi, K. (2014). Urinary phthalate metabolites among elementary school children of Korea: sources, risks, and their association with oxidative stress marker. *The Science of the Total Environment*, 472: 49-55.
- Kim, S.J., Jung, H.J., Hyun, D.H., Park, E.H., Kim, Y.M. y Lim, C.J. (2010). Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie*, 92: 927-932.
- Kluwe, W.M. (1982). Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. *Environmental Health Perspectives*, 45: 3-9.
- Kocbach-Bølling, A., Holme, J.A., Bornehag, C.G., Nygaard, U.C., Bertelsen, R.J., Nånberg, E., Bodin, J., Sakhi, A. K., Thomsen, C. y Becher, R. (2013). Pulmonary phthalate exposure and asthma is PPAR a plausible mechanistic link? *EXCLI Journal*, 12: 733-759.

- Koch, H.M. y Calafat, A.M. (2009). Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364: 2063-2078.
- Koch, H.M., Preuss, R. y Angerer, J. (2006). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure: an update and latest results. *International Journal of Andrology*, 29: 155-165.
- Kolanowski, T.J., Rozwadowska, N., Zimna, A., Nowaczyk, M., Siatkowski, M., Łabędź, W., Wiland, E., Gapiński, J., Jurga, S. y Kurpisz, M. (2020). Chromatin and transcriptome changes in human myoblasts show spatio-temporal correlations and demonstrate DPP4 inhibition in differentiated myotubes. *Scientific Reports*, 10: 14336.
- Kuehn, H., Liberzon, A., Reich, M. y Mesirov, J.P. (2008). Using GenePattern for Gene Expression Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 22: 1-39.
- Laatikainen, L.E., Castellone, M.D., Hebrant, A., Hoste, C., Cantisani, M.C., Laurila, J.P., Salvatore, G., Salerno, P., Basolo, F., Nasman, J., Dumont, J., Santoro, M. y Laukkanen, M. (2010). Extracellular superoxide dismutase is a thyroid differentiation marker downregulated in cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 17: 785-796.
- Labrada-Martagón, V., Tenorio-Rodríguez, P.A., Méndez-Rodríguez, L.C. y Zenteno-Savín, T. (2011). Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154: 65-75.
- Lapinskas, P.J., Brown, S., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S., Swanson, C., Cattley, R.C. y Corton, J.C. (2005). Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*, 207: 149-163.
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Wulff, J., Dela, F. y Hey-Mogensen, M. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects: Biomarkers of mitochondrial content. *The Journal of Physiology*, 590: 3349-3360.
- Leongómez, J.D. (2020). *Análisis de poder estadístico y cálculo de tamaño de muestra en R: Guía práctica*. Disponible en: <https://jdleongomez.info/es/post/power/>. [consulta 10 octubre 2022].
- Li, T., Zhu, S. y Ogihara, M. (2006). Using discriminant analysis for multi-class classification: an experimental investigation. *Knowledge and Information Systems*, 10: 453-472.
- Liska, D.J. (1998). The detoxification enzyme systems. *Alternative Medicine Review*, 3: 187-198.
- Little, R. y Rubin, D. (2019). *Statistical analysis with missing data*, 3rd ed. Wiley, Oxford.
- Liu, X., Zhang, Y., Sun, X., Zhang, W., Shi, X. y Xu, S. (2022). Di-(2-ethyl hexyl) phthalate induced oxidative stress promotes microplastics mediated apoptosis and necroptosis in mice skeletal muscle by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. *Toxicology*, 474: 153226.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lorenz, R., Bernhart, S.H., Höner zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F. y Hofacker, I.L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6: 26.
- Louis, K.S. y Siegel, A.C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: *Mammalian Cell Viability, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New Jersey, pp. 7-12.

- Lu, C., Luo, J., Liu, Y. y Yang, X. (2021). The oxidative stress responses caused by phthalate acid esters increases mRNA abundance of base excision repair (BER) genes in vivo and in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208: 111525.
- Lundgren, B. y DePierre, J.W. (1990). The metabolism of xenobiotics and its relationship to toxicity/genotoxicity: studies with human lymphocytes. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 592: 49-59.
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53: 401-426.
- Ma, X., Deng, D. y Chen, W. (2017). Inhibitors and activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In: *Enzyme inhibitors and activators*. 1st ed. InTech, London, England.
- Manuel, C.S., Suther, C., Moore, M.D. y Jaykus, L.A. (2021). Comparison of a one-step real-time RT-PCR and a nested real-time RT-PCR for a genogroup II norovirus reveals differences in sensitivity depending upon assay design and visualization. *PLOS ONE*, 16: e0248581.
- Martina, C.A., Weiss, B. y Swan, S.H. (2012). Lifestyle behaviors associated with exposures to endocrine disruptors. *Neurotoxicology*, 33: 1427-1433.
- Mayer, B.K. y Falkinham, J.O. (1986). Superoxide dismutase activity of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Infection and Immunity*, 53: 631-635.
- McDonald, B.I. y Ponganis, P.J. (2012). Lung collapse in the diving sea lion: hold the nitrogen and save the oxygen. *Biology Letters*, 8: 1047-1049.
- Mejia-Sanchez, F., Montenegro-Morales, L.P. y Castillo-Cadena, J. (2018). Enzymatic activity induction of GST-family isoenzymes from pesticide mixture used in floriculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 601-606.
- Miranda, L.D. (2008). Química de los radicales libres. En: *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. 1^{ra} ed. Manual Moderno, México.
- Mojica, W.D., Frisch, N.K. y Paterson, J.K. (2015). Core needle biopsy wash optimization: enabling specimen integrity for both cytological and histological evaluation. *Anticancer Research*, 35: 59055913.
- Molina-Ortiz, D., González-Zamora, J.F., Camacho-Carranza, R., Lopez-Acosta, O., Colin-Martinez, O., Domínguez-Ramírez, A.M. y Vences-Mejía, A. (2013). Xenobiotic-metabolizing enzymes in skeletal muscle of children and adolescents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4: 231-239.
- Møller, I.M., Rogowska-Wrzesinska, A. y Rao, R.S.P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics*, 74: 2228-2242.
- Moore, C.D., Crocker, D.E., Fahlman, A., Moore, M.J., Willoughby, D.S., Robbins, K.A., Kanatous, S.B. y Trumble, S.J. (2014). Ontogenetic changes in skeletal muscle fiber type, fiber diameter and myoglobin concentration in the Northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Frontiers in Physiology* 5: 1-9.
- Moore, C.D., Fahlman, A., Crocker, D.E., Robbins, K.A. y Trumble, S.J. (2015). The degradation of proteins in pinniped skeletal muscle: viability of post-mortem tissue in physiological research. *Conservation Physiology* 3: cov019.
- Moore, S.E. (2008). Marine mammals as ecosystem sentinels. *Journal of Mammalogy*, 89: 534-540.
- Motohashi, N. y Asakura, A. (2014). Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2: 1-11.

- Mueller, A., Graebisch, C., Wichmann, G., Bauer, M. y Herbarth, O. (2006). How to predict the potential effect of chemicals on human health: an extended question of environmental toxicology. In: *Environmental Toxicology*. WIT Press, Southampton, England, pp. 3-9.
- National Research Council. (2008). *Phthalates and cumulative risk assessment: the tasks ahead*. 1st ed. National Academies Press, Washington D. C.
- Nelli, G. y Pamanji, S.R. (2017). Di-n-butyl phthalate prompts interruption of spermatogenesis, steroidogenesis, and fertility associated with increased testicular oxidative stress in adult male rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24: 18563-18574.
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A. y Ouddane, B. (2015). Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environmental Science & Technology*, 49: 4019-4035.
- Nielsen, A.R., Mounier, R., Plomgaard, P., Mortensen, O.H., Penkowa, M., Speerschneider, T., Pilegaard, H. y Pedersen, B.K. (2007). Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle – effect of exercise and muscle fiber type composition. *The Journal of Physiology*, 584: 305-312.
- Nishimoto, S., Koike, S., Inoue, N., Suzuki, T. y Ogasawara, Y. (2017). Activation of Nrf2 attenuates carbonyl stress induced by methylglyoxal in human neuroblastoma cells: Increase in GSH levels is a critical event for the detoxification mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483: 874-879.
- Norman, A., Börjeson, H., David, F., Tienpont, B. y Norrgren, L. (2007). Studies of uptake, elimination, and late effects in atlantic salmon (*Salmo salar*) dietary exposed to Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) during early life. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 235-242.
- Okado-Matsumoto, A. y Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 38388-38393.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S. y Stadtman, E.R. (1987). Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 5488-5491.
- Osório-Alves, J., Matta-Pereira, L., Cabral-Coutinho do Rêgo Monteiro, I., Pontes dos Santos, L.H., Soares-Marreiros, A., Carneiro-Loureiro, A.C., Calado-Lima, C., Leal-Cardoso, J., Pires, D., Soares, R. y Marilande, V. (2020). Strenuous acute exercise induces slow and fast twitch-dependent NADPH oxidase expression in rat skeletal muscle. *Antioxidants* 9: 57.
- Owczarzy, R., You, Y., Moreira, B.G., Manthey, J.A., Huang, L., Behlke, M.A. y Walder, J.A. (2004). Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: Improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry*, 43: 3537-3554.
- Pan, G., Hanaoka, T., Yu, L., Na, J., Yamano, Y., Hara, K., Ichiba, M., Nakadate, T., Kishi, R., Yin, H., Zhang, S. y Feng, Y. (2011). Associations between hazard indices of di-n-butylphthalate and di-2-ethylhexylphthalate exposure and serum reproductive hormone levels among occupationally exposed and unexposed Chinese men. *International Journal of Andrology*, 34: e397-406.
- Pan, L., Zhu, B., Hao, W., Zeng, X., Vlahopoulos, S.A., Hazra, T.K., Hegde, M.L., Radak, Z., Bacsi, A., Brasier, A., Ba, X. y Boldogh, I. (2016). Oxidized guanine base lesions function in 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated epigenetic regulation of nuclear factor κB-driven gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 291: 25553-25566.

- Pansarasa, O., Castagna, L., Colombi, B., Vecchiet, J., Felzani, G. y Marzatico, F. (2000). Age and sex differences in human skeletal muscle: Role of reactive oxygen species. *Free Radical Research*, 33: 287-293.
- Park, C.G., Sung, B., Ryu, C.S. y Kim, Y.J. (2020). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and lipid accumulation in zebrafish liver cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 230: 108704.
- Park, J., Lee, J. y Choi, C. (2011). Mitochondrial network determines intracellular ROS dynamics and sensitivity to oxidative stress through switching inter-mitochondrial messengers. *PLoS ONE*, 6: e23211.
- Patton, S. y Kurtz, G.W. (1951). 2-thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *Journal of dairy science*, 34: 669-674.
- Pereira, S., Pinto, A.L., Cortes, R., Fontainhas-Fernandes, A. y Coimbra, A.M. (2013). Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90: 157-166.
- Persky, A.M., Greene, P.S., Stublely, L., Howell, C.O., Zaulyanov, L., Brazeau, G.A. y Simpkins, J.W. (2000). Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, 1: 59-66.
- Pinton, P., Romagnoli, A., Rizzuto, R. y Giorgi, C. (2008). Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Current Molecular Medicine*, 8: 119-130.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. y Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 1-13.
- Ponganis, P.J. y Pierce, R.W. (1978). Muscle metabolic profiles and fiber-type composition in some marine mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 59: 99-102.
- Pontén, F., Jirström, K. y Uhlen, M. (2008). The human protein atlas—a tool for pathology. *The Journal of Pathology*, 216: 387-393.
- Porter, K.A. (1957). Effect of homologous bone marrow injections in x-irradiated rabbits. *British Journal of Experimental Pathology*, 38: 401-412.
- Powers, S.K., Ji, L.L., Kavazis, A.N. y Jackson, M.J. (2011). Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*, 1(2): 941-969.
- Pugliares, K.R., Bogomolni, A., Touhey, K.M., Herzig, S.M., Harry, C.T. y Moore, M.J. (2007). *Marine mammal necropsy: an introductory guide for stranding responders and field biologists*. 1st ed. Woods Hole Oceanographic Institution, Massachusetts.
- Quackenbush, J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*, 32: 496-501.
- Rael, L.T., Bar-Or, R., Ambruso, D.R., Mains, C.W., Slone, D.S., Craun, M.L. y Bar-Or, D. (2009). Phthalate esters used as plasticizers in packed red blood cell storage bags may lead to progressive toxin exposure and the release of pro-inflammatory cytokines. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2: 166-171.
- Rask, L., Balslev, E., Søkilde, R., Høgdall, E., Flyger, H., Eriksen, J. y Litman, T. (2014). Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status. *Cellular Oncology*, 37: 215-227.

- Ravel-Chapuis, A., Klein Gunnewiek, A., Bélanger, G., Crawford Parks, T.E., Côté, J. y Jasmin, B.J. (2016). Staufen1 impairs stress granule formation in skeletal muscle cells from myotonic dystrophy type 1 patients. *Molecular Biology of the Cell*, 27: 1728-1739.
- Ravussin, E. y Smith, S.R. (2006). Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967: 363-378.
- Reid, A.M., Brougham, C.A., Fogarty, A.M. y Roche, J.J. (2007). An investigation into possible sources of phthalate contamination in the environmental analytical laboratory. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87: 125-133.
- Rian, M.B., Vike-Jonas, K., Gonzalez, S.V., Ciesielski, T.M., Venkatraman, V., Lindstrøm, U., Jenssen, B.M. y Asimakopoulos, A.G. (2020). Phthalate metabolites in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from Norwegian coastal waters. *Environment International*, 137: 105525.
- Ringwood, A.H., Hoguet, J., Keppler, C. y Gielazyn, M. (2004). Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Environmental Research*, 58: 151-155.
- Roberts, R.A., Soames, A.R., Gill, J.H., James, N.H. y Wheeldon, E.B. (1995). Non-genotoxic hepatocarcinogenesis stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis*, 16: 1693-1698.
- Rosado-Berrios, C.A., Vélez, C. y Zayas, B. (2011). Mitochondrial permeability and toxicity of Di ethylhexyl and Mono ethylhexyl Phthalates on TK6 human lymphoblasts cells. *Toxicology In Vitro*, 25: 2010-2016.
- Rosero, D.H., Salazar, L. y Tovar, M.A. (2015). Músculo esquelético y lesión por reperfusión: ultraestructura, alteración y regeneración. Revisión. *Revista Médica de Risaralda*, 21: 58-68.
- Routti, H., Harju, M., Lühmann, K., Aars, J., Ask, A., Goksøyr, A., Kovacs, K.M. y Lydersen, C. (2021). Concentrations and endocrine disruptive potential of phthalates in marine mammals from the Norwegian Arctic. *Environment International*, 152: 106458.
- Routti, H., Letcher, R.J., Arukwe, A., van Bavel, B., Yoccoz, N.G., Chu, S. y Gabrielsen, G.W. (2008). Biotransformation of PCBs in relation to phase I and II xenobiotic-metabolizing enzyme activities in ringed seals (*Phoca hispida*) from Svalbard and the Baltic Sea. *Environmental Science & Technology*, 42: 8952-8958.
- RStudio Team. (2020). RStudio: integrated development for R. Available in: <http://www.rstudio.com/> [consultado 10 de octubre 2020].
- Rusyn, I., Peters, J.M. y Cunningham, M.L. (2006). Modes of action and species-specific effects of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in the liver. *Critical Reviews in Toxicology*, 36: 459-479.
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E. y Saso, L. (2020). An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules*, 25: 5474.
- Salin, K., Auer, S.K., Rudolf, A.M., Anderson, G.J., Cairns, A.G., Mullen, W., Hartley, R.C., Selman, C. y Metcalfe, N. (2015). Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species *in vivo*. *Biology Letters*, 11: 20150538.
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 1460-1465.
- Saraiva, A.S., Sarmiento, R.A., Gravato, C., Rodrigues, A.C.M., Campos, D., Simão, F.C.P. y Soares, A.M. (2020). Strategies of cellular energy allocation to cope with paraquat-induced oxidative

- stress: Chironomids vs Planarians and the importance of using different species. *Science of The Total Environment*, 741: 140443.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. y Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to image: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9: 671-675.
- Schrader, M. y Fahimi, H.D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 122: 383-393.
- Schultz, E. (1996). Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Developmental Biology*, 175: 84-94.
- Ściskalska, M. y Milnerowicz, H. (2020). The role of GST π isoform in the cells signalling and anticancer therapy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24: 8537-8550.
- Selwitz, C. (1988). *Cellulose nitrate in conservation*. 1^{ra} ed. Getty Conservation Institute, California.
- Shen, B., Wang, W., Ding, L., Sao, Y., Huang, Y., Shen, Z., Zhuo, Y., Wei, Z. y Zhang, W. (2015). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 rescues the oxidative stress induced by di-N-butylphthalate in testicular Leydig cells. *Human & Experimental Toxicology*, 34: 145-152.
- Shono, T. y Taguchi, T. (2014). Short-time exposure to mono-n-butyl phthalate (MBP)-induced oxidative stress associated with DNA damage and the atrophy of the testis in pubertal rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21: 3187-3190.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F. y Halbrook, R.S. (1992). Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Analysis*, 12: 353-360.
- Siderowf, A., Aarsland, D., Mollenhauer, B., Goldman, J.G. y Ravina, B. 2018. Biomarkers for cognitive impairment in Lewy body disorders: Status and relevance for clinical trials: Biomarkers of cognitive impairment. *Movement Disorders*, 33: 528-536.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4: 180-183.
- Sies, H. (2020). *Oxidative Stress: Eustress and Distress*. 1st ed. Academic Press, California, USA.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91: 31S-38S.
- Sies, H., Berndt, C. y Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86: 715-748.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. y Higgins, D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7: 539.
- Singh, S. y Li, S.S.L. (2011). Phthalates: Toxicogenomics and inferred human diseases. *Genomics*, 97: 148-157.
- Sinha, A.K., Abdelgawad, H., Zinta, G., Dasan, A.F., Rasoloniriana, R., Asard, H., Blust, R. y De Boeck, G. (2015). Nutritional status as the key modulator of antioxidant responses induced by high environmental ammonia and salinity stress in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *PLoS ONE*, 10: e0135091.
- Snijders, T., Nederveen, J.P., McKay, B.R., Joannisse, S., Verdijk, L.B., van Loon, L.J.C. y Parise, G. (2015). Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Frontiers in Physiology*, 6: 283.

- Stadtman, E.R. y Levine, R.L. (2006). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 191-208.
- Standaert, F.G. (1988). Absorption and distribution of xenobiotics. *Environmental Health Perspectives*, 77: 63-71.
- Stewart, B.S. y DeLong, R.L. (1995). Double migrations of the northern elephant seal, *Mirounga angustirostris*. *Journal of Mammalogy*, 76: 196-205.
- Su, J.L., Simmons, C.J., Wisely, B., Ellis, B. y Winegar, D.A. (1998). Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAb. *Hybridoma*, 17: 47-53.
- Sullivan-Gunn, M.J. y Lewandowski, P.A. (2013). Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. *BMC Geriatrics*, 13: 104.
- Sung, H.H., Kao, W.Y. y Su, Y.J. (2003). Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic Toxicology*, 64: 25-37.
- Suzuki, K. (2000). Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. En: *Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University Press, New York. pp. 91-95.
- Tetz, L.M., Cheng, A.A., Korte, C.S., Giese, R.W., Wang, P., Harris, C., Meeker, J.D. y Loch-Carus, R. (2013). Mono-2-ethylhexyl phthalate induces oxidative stress responses in human placental cells in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268: 47-54.
- Townsend, D.M. (2007). S-Glutathionylation: Indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Molecular Interventions*, 7: 313-324.
- Townsend, D.M. y Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22: 7369-7375.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C., Odeberg, J., Djureinovic, D., Ottosson, J., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J., Hamsten, M., Feilitzén, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. y Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347: 1260419.
- Uno, Y., Murayama, N., Kunori, M. y Yamazaki, H. (2013). Characterization of microsomal Glutathione S -Transferases MGST1, MGST2, and MGST3 in cynomolgus macaque. *Drug Metabolism and Disposition*, 41: 1621-1625.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. y Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40: e115-e115.
- Uren-Webster, T.M., Bury, N., van Aerle, R. y Santos, E.M. (2013). Global transcriptome profiling reveals molecular mechanisms of metal tolerance in a chronically exposed wild population of brown trout. *Environmental Science & Technology*, 47: 8869-8877.
- Vázquez-Medina, J.P., Sonanez-Organis, J., Burns, J., Zenteno-Savín, T. y Ortiz, R. (2011). Antioxidant capacity develops with maturation in the deep-diving hooded seal. *Journal of Experimental Biology*, 214: 2903-2910.
- Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T. y Elsner, R. (2006). Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: Potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142: 198-204.

- Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., Elsner, R. y Ortiz, R. (2012). Coping with physiological oxidative stress: a review of antioxidant strategies in seals. *Journal of Comparative Physiology*, 182: 741-750.
- Viloria-Gómora, L., Olavarrieta-García, T. y Urbán-Ramírez, J. (2018). Vulnerabilidad de los mamíferos marinos ante macrolásticos y microlásticos. En: *Bioacumulación y transferencia de metales y contaminantes emergentes a través de las cadenas tróficas marinas*. Samsara, México, pp. 93-108.
- Viswanathan, M., Mullainadhan, V., Chinnaiyan, M. y Karundevi, B. (2017). Effects of DEHP and its metabolite MEHP on insulin signalling and proteins involved in GLUT4 translocation in cultured L6 myotubes. *Toxicology*, 386: 60-71.
- Vorkamp, K., Dam, M., Riget, F., Fauser, P., Bossi, R. y Hansen, A. (2004). *Screening of «new» contaminants in the marine environment of Greenland and the Faroe Islands*. Ministry of Environment, National Environmental Research Institute, Roskilde, Denmark.
- Wang, K., Maayah, M., Sweasy, J. y Alnajjar, K. (2021). The role of cysteines in the structure and function of OGG1. *Journal of Biological Chemistry*, 296: 100093.
- Wang, K., Shindoh, H., Inoue, T. y Horii, I. (2002). Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *The Journal of Toxicological Sciences*, 27: 229-237.
- Wang, Q., Wang, W. y Zhang, A. (2021). TET-mediated DNA demethylation plays an important role in arsenic-induced HBE cells oxidative stress via regulating promoter methylation of OGG1 and GSTP1. *Toxicology in Vitro*, 72: 105075.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A. y Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217: 1915-1928.
- Wang, Y., Chen, H., Long, C., Tsai, C., Hsieh, T., Hsu, C. y Tsai, E. (2012). Possible mechanism of phthalates-induced tumorigenesis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 28: S22-S27.
- Wei, J., Hao, Q., Chen, C., Li, J., Han, X., Lei, Z., Wang, T., Wang, Y., You, X., Chen, X., Li, H., Ding, Y., Huang, W., Hu, Y., Lin, S., Shen, H. y Lin, Y. (2020). Epigenetic repression of miR-17 contributed to di(2-ethylhexyl) phthalate-triggered insulin resistance by targeting Keap1-Nrf2/miR-200a axis in skeletal muscle. *Theranostics*, 10: 9230-9248.
- Weitzner, E., Fanter, C. y Hindle, A. (2020). Pinniped ontogeny as a window into the comparative physiology and genomics of hypoxia tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 60: 1414-1424.
- Wilhelm-Filho, D., Sell, F., Ribeiro, L., Ghislandi, M., Carrasquedo, F., Fraga, C., Wallauer, J., Simoes-Lopes, P. y Uhart, M. (2002). Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133: 885-892.
- Williams, C. y Gallagher, E. (2013). Effects of cadmium on olfactory mediated behaviors and molecular biomarkers in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*, 140-141: 295-302.
- Winterbourn, C. y Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 322-328.
- World Health Organization. (2017). *Guidelines for drinking-water quality.4th ed.* World Health Organization, Switzerland.

- Wu, W., Tang, Y. y Sun, Z. (2013). Di-(2-ethylhexyl) phthalate activates the apoptosis Caspase pathway in rat Leydig cells in vitro. *National Journal of Andrology*, 19: 683-688.
- Wu, Y., Li, J., Yan, B., Zhu, Y., Liu, X., Chen, M., Li, D., Lee, C., Yang, X. y Ma, P. 2017. Oral exposure to dibutyl phthalate exacerbates chronic lymphocytic thyroiditis through oxidative stress in female Wistar rats. *Scientific Reports*, 7: 15469.
- Wu, Z., Li, J., Ma, P., Li, B., Yang, X. (2015). Long-term dermal exposure to diisononyl phthalate exacerbates atopic dermatitis through oxidative stress in an FITC-induced mouse model. *Frontiers in Biology*, 10: 537-545.
- Wypych, G. (2017). *Handbook of plasticizers*. 3rd ed. ChemTec Publishing, Toronto.
- Xie, Z., Zhang, X., Wu, J. y Wu, Y. (2023). Risk assessment of phthalate metabolites accumulated in fish to the Indo-Pacific humpback dolphins from their largest habitat. *Science of the Total Environment*, 876: 163094.
- Yang, W. y Stockwell, B.R. (2016). Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in Cell Biology*, 26: 165-176.
- Yang, Y., Ju, L., Fan, J., Cai, S., Sun, L. y Li, Y. (2022). Association of urinary phthalate metabolites with sarcopenia in US adults: NHANES 1999–2006. *Environmental Science and Pollution Research*, 29: 7573-7582.
- Yavasoglu, N., Koksall, C., Dagdeviren, M., Aktug, H. y Yavasoglu, A. (2014). Induction of oxidative stress and histological changes in liver by subacute doses of butyl cyclohexyl phthalate. *Environmental Toxicology*, 29: 345-353.
- Ye, H., Ha, M., Yang, M., Yue, P., Xie, Z. y Liu, C. (2017). Di2-ethylhexyl phthalate disrupts thyroid hormone homeostasis through activating the Ras/Akt/TRHr pathway and inducing hepatic enzymes. *Scientific Reports*, 7: 40153.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. y Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13: 134.
- Yin, H., Price, F. y Rudnicki, M. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93: 23-67.
- Yu, Q., Xiong, X., He, J., Zuo, Y., Chen, Y. y Wang, C. (2019). Photolysis of bis(2-ethylhexyl) phthalate in aqueous solutions at the presence of natural water photoreactive constituents under simulated sunlight irradiation. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 26797-26806.
- Zenteno-Savín, T., Labrada-Martagón, V. y Gaxiola-Robles, R. (2018). Respuestas fisiológicas de organismos marinos ante contaminantes. En: *Bioacumulación y transferencia de metales y contaminantes emergentes a través de las cadenas tróficas marinas*. Samsara, México. pp. 109-131.
- Zenteno-Savín, T., Vázquez-Medina, J.P., Cantú-Medellín, N., Ponganis, P.J. y Elsner, R. (2011). Ischemia/reperfusion in diving birds and mammals: how they avoid oxidative damage. En: *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, Blackwell Publishing, Chichester, West Sussex, England. pp. 178-189.
- Zhang, L., Qin, Z., Li, R., Wang, S., Wang, W., Tang, M. y Zhang, W. (2019). The role of ANXA5 in DBP-induced oxidative stress through ERK/Nrf2 pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 72: 103236.

- Zhang, Y., Wang, S., Zhao, T., Yang, L., Guo, S., Shi, Y., Zhang, X., Zhou, L. y Ye, L. (2019). Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) promoted lipid accumulation via JAK2/STAT5 and aggravated oxidative stress in BRL-3A cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184: 109611.
- Zhao, Z., Ji, K., Shen, X., Zhang, W., Wang, R., Xu, W. y Wei, W. (2019). Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes hepatic fibrosis by regulation of oxidative stress and inflammation responses in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68: 109-119.
- Zhou, L., Beattie, M.C., Lin, C.-Y., Liu, J., Traore, K., Papadopoulos, V., Zirkin, B.R. y Chen, H. (2013). Oxidative stress and phthalate-induced down-regulation of steroidogenesis in MA-10 Leydig cells. *Reproductive Toxicology*, 42: 95-101.
- Zhou, S., Han, M., Ren, Y., Yang, X., Duan, L., Zeng, Y. y Li, J. (2020). Dibutyl phthalate aggravated asthma-like symptoms through oxidative stress and increasing calcitonin gene-related peptide release. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 199: 110740.
- Zhou, X., Zhuang, Z., Wang, W., He, L., Wu, H., Cao, Y., Pan, F., Zhao, J., Hu, Z., Sekhar, C. y Guo, Z. (2016). OGG1 is essential in oxidative stress induced DNA demethylation. *Cellular Signalling*, 28: 1163-1171.
- Zuo, H.X., Li, J.Q., Han, B., Ke, C.J., Liu, X.D., Zhang, Y.C., Li, L. y Yang, X. (2014). Di-(n-butyl)-phthalate-induced oxidative stress and depression-like behavior in mice with or without ovalbumin immunization. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 27: 268-280.

11. ANEXOS

Anexo A. Efectos de los ftalatos en tejidos de especies modelo

Estrés oxidativo en diversos tejidos de humano y murinos inducido por la exposición *in vivo* e *in vitro* a ftalatos.

Sujeto	Exposición	Tejido	Ftalato	Dosis	ER	Antioxidante	Marcador de estrés	Referencia
Humano	Ambiental	Orina y suero	MEHP MEHHP MEOHP MECPP MnBP MiBP MEP MBzP MCNP MCOP	-	-	-	↑GGT, ↑CRP	Ferguson et al. (2011)
Humano	Medio de cultivo	Células placentarias	MEHP	11.25-180 μM	H ₂ O ₂ y ·OH	-	↑PTGS2, ↑GLRX2, ↑TXNRD1, ↓DHCR24, SCARA3, PRNP and AOX1	Tetz et al. (2013)
Humano	Ambiental	Orina	MMP MEP MCP MBP MiBP MBzP ΣMEHP ΣFtalatos	>20 μg kg ⁻¹ d ⁻¹	-	-	↑8-OHdG	Guo et al. (2014)
Humano	Ambiental	Orina	MiBP MnBP	-	-	-	↑MDA	Kim et al (2014)

			MEHP 5-oxo- MEHP 5-OH- MEHP MEP					
Humano	Medio de cultivo	Estroma endometrial	DEHP	10-1000 pmol	↑ERO y *H ₂ O ₂	↓SOD, ↓GPx, ↓CAT y ↓HO-1	-	Cho et al. (2015)
Humano	Ambiental	Orina	MEHP MECPP ΣDEHP MBzP MBP MiBP MEP MCP	-	-	-	8-isoprostane	Ferguson et al. (2017)
Humano	Ambiental	Orina	MEHP MEHHP MEOHP MnBP MBzP MiBP MEP	-	-	-	↑8-OHdG	Franken et al. (2017)
Humano	Ambiental	Orina	MMP MEP MnBP MiBP	-	-	-	↑MDA and ↑8-OHdG	Dong et al. (2018)

			MBzP MEHP MEOHP MECPP MEHHP MCMHP					
Humano	Ambiental	Orina, células granulosas y semen	MEP MiBP MnBP MBzP MECPP MEHHP MEOHP MEHP	-	H ₂ O ₂	↑CAT y ↑Capacidad antioxidante total	↑MDA and ↑8-OHdG	Al-Saleh et al. (2019)
Humano	Ambiental	Orina y plasma	DEHP MEHP MMP MEP MiBP MnBP MBzP MEHHP MEOHP MECPP MiNP MiDP	-	-	-	↑MDA, ↑8-OHdG and iNO	Chang et al. (2019)

Humano	Ambiental	Plasma	DEHP MEHP	-	*H ₂ O ₂	↑GPx, ↑SOD, ↑CAT y ↑TrxR	↑MDA and ↑8-OHdG	Gurdemir et al. (2019)
Ratón	Oral	Hígado	BCP	100- 400 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	-	↓SOD y ↓CAT	↑TBARS and ↑iNO	Yavaşoğlu et al. (2014)
Ratón	Medio de cultivo	Folículos ováricos antrales	DEHP	1-100 µg mL ⁻¹	↑ERO y ↑ERN	↓SOD, GPx y CAT	-	Wang et al. (2012)
Ratón	Medio de cultivoe	Células de Leydig	MEHP	0-400 µM	↑ERO	(Agotado) GSH	-	Zhou et al. (2013)
Ratón	Oral	Plasma, cerebro y vaso	DBP	0.45- 30 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	↑ERO	(Adicionada) Vitamina E ↓GSH	↑MDA	Zuo et al. (2014)
Ratón	Medio de cultivo	Células de Leydig	DBP	10 µM	↑ERO	GSH/GSSG	(knockdown) Nrf2	Shen et al. (2015)
Ratón	Dermal	Oído	DINP	1.4- 140 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	↑ERO	GSH/GSSG y ↑HO-1 ↓GSH	↑Nrf2, ↑NQO1 and PRDX6 ↑MDA	Wu et al. (2015)

Ratón	Oral	Plasma, hígado y riñón	DIDP	0.15-150 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	↑ERO	↓GSH	↑MDA and ↑8-OHdG	Chen et al. (2019)
Ratón	Medio de cultivo	Células de Leydig y Sertoli	DBP	0-50 mg L ⁻¹	↑ERO	↓SOD y ↓HO-1	↓MDA, ↑Nrf2, ↓ANXA5, ↑NQO1, ↑ERK/p-ERK protein	Zhang et al. (2019)
Ratón	Oral	Plasma y fluido bronco-alveolar	DBP	40 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	-	↓GSH	↑MDA and ↑8-OHdG	Zhou et al. (2020)
Rata	Oral	Orina y testículos	MBP	119.6-192.4 mg rat ⁻¹ day ⁻¹	-	(Adicionada) Vitamina C y E	↑8-OHdG	Shono and Taguchi (2014)
Rata	Parenteral	Aparato reprod. de machos y hembras	DBP	100-500 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	-	↓SOD, ↓GPx y ↓CAT	↑MDA	Nelli and Pamanji (2017)
Rata	Oral	Plasma	DBP	0.5-50 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	↑ERO	-	↑8-OHdG	Wu et al. (2017)
Rata	Oral	Hepatocitos y fibroblastos	MEHP	0-200 μM	-	↓SOD, ↑AST y ALT	↑TBARS	Zhang et al. (2019)
Rata	Oral	Plasma e hígado	DEHP	500 mg kg ⁻¹	-	↓SOD y ↓GSH	↑MDA	Zhao et al. (2019)

d^{-1}

*, Inferidas pero no cuantificadas; Σ , sumatoria de todos los metabolitos derivados del componente original; \uparrow , regulación hacia el incremento; \downarrow , regulación hacia decremento; RS, especies reactivas; ERO, especies reactivas de oxígeno; ERN, especies reactivas de nitrógeno; DEHP, di 2-ethylhexyl, ftalato; MEHP, mono 2-etilhexil, ftalato; MiBP, mono-isobutil ftalato; MnBP, mono-n-butyl ftalato; 5-oxo-MEHP, mono 2-etil-5-oxohexil, ftalato; 5-OH-MEHP, mono 2-ethyl-5-hydroxyhexyl, ftalato; MEP, monoethyl ftalato; MEHHP, mono 2-ethyl-5-hydroxyhexyl, ftalato; MEOHP, mono 2-ethyl-5-oxohexil, ftalato; MBzP, mono-benzil ftalato; MMP, mono-methyl ftalato; MCPP, mono-3-carboxipropil ftalato; MECPP, mono-5-carboxi-2-etilpentil ftalato; MBP, mono-nbutil ftalato; MiNP, mono-isononil ftalato; MiDP, mono-isodecil ftalato; MCMHP, mono-2-carboximetil-hexil ftalato; BCP, di 2-butoxietil, ftalato; DBP, dibutil ftalato; MCNP, mono-carboxiisononil ftalato; MCOP, mono-carboxioctyl ftalato; DiNP, di-isononil ftalato; DiDP, di-isodecil ftalato; GPx, glutatión peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; GSH, Glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GGT, gamma glutamiltransferasa; CRP, proteína C-reactiva; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; TrxR, tioredoxina reductasa; MDA, malondialdehido; 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; PTGS2, prostaglandina-endoperóxido sintasa 2; GLRX2, glutaredoxina 2; TXNRD1, tioredoxina reductasa 1; DHCR24, 24-dehidrocholesterol reductasa; SCARA3, receptor eliminador clase A miembro 3 ; PRNP, proteína priónica; AOX1, aldehído oxidasa 1; iNOS, inducible óxido nítrico sintetasa; Nrf2, actor nuclear 2 derivado del eritroide 2; ANXA5, anexina A5; NQO1, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; p-ERK, fosfo-ERK; HO-1, hemooxigenasa-1; NQO1, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato quinona oxidorreductasa 1; PRDX6, peroxirredoxina 6; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Anexo B. Consentimiento informado



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (adultos)

Nombre del estudio:	Evaluación del daño oxidativo y/o afectación de mecanismos de detoxificación en células musculares en cultivos primarios en respuesta a la exposición a contaminantes asociados a plásticos, como el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP)
Patrocinador externo (si aplica):	
Lugar y fecha:	Guadalajara Jalisco México 21 octubre 2019
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	El estudio tiene como objetivo el Evaluar si los contaminantes asociados a plásticos, como el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), inducen daño oxidativo y/o afectan los mecanismos de detoxificación en células musculares en cultivos primarios humano. Usted ha sido invitada a participar en este estudio porque pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto. Estudiaremos cual es la respuesta de los contaminantes y en especial los asociados a los plásticos los cuales están presentes en la vida moderna. Al igual que usted, serán invitada otra persona más a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.
Procedimientos:	Se recolectará no más de 2 g de tejido muscular (del tamaño de un frijol) durante la cirugía que usted tiene programada. Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> • Le pediremos nos done 2 grs de tejido muscular el cual quedará expuesto en el momento de su cirugía este se depositará en un recipiente que será facilitado por el equipo.
Posibles riesgos y molestias:	<ul style="list-style-type: none"> • Esto no cambia en nada la técnica de abordaje previamente planeada por su cirujano. • No incrementa el riesgo anestésico ni quirúrgico • No le ocasionara ninguna más molestia inherente a la misma cirugía que le están realizando.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted. No recibirá ningún beneficio directo al participar en este estudio. Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la cadena causal de los riesgos para la salud que los contaminantes abióticos en especial de los relacionados a los plásticos representan para la población en general. Además, los resultados de este estudio brindarán información relevante para el mejor manejo de la exposición a plásticos

	y aportara información de gran utilidad para futuros programas de prevención primaria y secundaria.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Los resultados de los trabajos realizados se les hará llegar en forma escrita
Participación o retiro:	Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera el que nosotros le brindemos los resultados hasta el momento recabados.
Privacidad y confidencialidad:	<p>La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o, (su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales y sus resultados serán guardados en un archivero bajo llave en las oficinas del área de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el CIBO Guadalajara Jalisco México. Sólo el equipo de investigación tendrá acceso a su información.</p> <p>Sólo el equipo de investigadores que se encuentran participando en este estudio sabrá que usted ha sido incluida en la investigación. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información sobre usted, o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o bienestar (por ejemplo, si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia): o si lo requiere la ley. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, su nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarla/o no estará vinculada con la información que nos proporcione en la entrevista y con los resultados de sus estudios de gabinete y laboratorio. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos. Guardaremos toda su información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida 5 años después de concluir el estudio.</p>

Declaración de consentimiento:

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

No acepto participar en el estudio.

Si acepto participar y que se tome la muestra solo para este estudio.

Si acepto participar y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su tejido muscular hasta por __2_ años tras lo cual se destruirá la misma.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadora o Investigador Responsable:

Dr Oscar Kurt Bitzer Quintero teléfono 33 1605 6856

Colaboradores:

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 20:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Ramón Gaxiola Robles, que es el investigador responsable del área médica, al teléfono: 612 3485229 en el Hospital General de Zona No 1 del IMSS ubicado en Boulevard 5 de febrero esquina Héroes de la Independencia, Colonia Centro, La Paz Baja California Sur, Cod Postal 23000. Teléfono. - 612 12 27377. E-mail: ramon.gaxiola@imss.gob.mx

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité Local de Ética de Investigación en Salud del CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comiteeticainv.imss@gmail.com

Nombre y firma del participante

Testigo 1

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810-009-013

Anexo C. Aprobación del proyecto por parte del IMSS



Dictamen de Aprobación

Martes, 28 de enero de 2020

Ref. 09-B5-61-2800/202000/

Dr. Oscar Kurt Bitzer Quintero
 Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CENTRO DE INVESTIGACION
 BIOMEDICA 01)
 Jalisco

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Evaluación del daño oxidativo y afectación de mecanismos de detoxificación en células musculares expuestas a contaminantes asociados a plásticos, como el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP)**, fue sometido a la consideración de este Comité Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2020-785-008.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comité en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Ateptamente,


 Dra. María Susana Navarrete Navarro
 Secretaria Ejecutiva
 Comité Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

Se anexa dictamen

SNN/ iah. F-CNIC-2019-174

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ext 21210 canaia@cia.gob.mx

Anexo D. Mix de reacción y programa de amplificación por PCR punto final.

PCR punto final

Reactivos	Vol. de reacción (µL)
Buffer para PCR 10X	1.25
MgCl ₂ 50 mM	0.375
dNTP's mix	0.25
Oligo sentido	0.625
Oligo antisentido	0.625
ADN polimerasa	0.125
cDNA	1
H ₂ O miliq	8.25
Total	12.5

Programa de PCR			
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
34 ciclos	Desnaturalización inicial	95	2
	Desnaturalización	95	30
	Alineación	60	30
	Extensión	72	45
	Extensión final	72	5
	Almacenamiento	-20	∞

Retrotranscripción

Reactivos	Vol. de reacción (µL)
Agua DEPC	5.3
Buffer de rxn 5X	4.0
MgCl ₂ 25 mM	2.4
dNTP's mix 10 nM	1
RNasin® recombinante	0.5
Transcriptasa reversa (RT)	0.8
Oligo dT 15	2
RNA (1 µg µL ⁻¹)	10
Total	28

Incubadora			
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Ciclos de incubación		25	10
		45	60
		90	5
	Almacenamiento	-20	∞

qPCR

Reactivos	Vol. de reacción (µL)
Ssofast	5
cDNA	1
Oligo sentido	0.3
Oligo antisentido	0.3
H ₂ O miliq	3.4
Total	10

Programa de qPCR			
		Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95	5 min
39 ciclos	Desnaturalización	95	15 s
	Alineación	57,59,60,61,62,63 o 64	15 s
	Extensión	72	15 s
	Curva de cambio en la absorbancia	60 95/0.5 incremento	5 s
	Almacenar	-20	∞