

Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**EFFECTO DE LOS PARABENOS SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS EN
UN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA
HUMANA**

Tesis que presenta:

M en C. Elena de la Cruz Herrera Cogco

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

en la especialidad en Toxicología

Directores de tesis

Dr. Arnulfo Albores Medina

Dra. Esther López Bayghen Patiño

México

Mayo, 2020

Comité sinodal

Dra. Isabel Hernández Ochoa

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dr. Adolfo Sierra Santoyo

Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dr. José Alonso Fernández Guasti

Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-IPN

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Biología celular y Molecular, UAM

El presente trabajo estuvo bajo la dirección de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño y del Dr. Arnulfo Albores Medina y se llevó a cabo en el en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.

Este trabajo contó con apoyo económico del programa PEI-CONACyT,
Proyecto número 231793 otorgado a la Dra. Esther Ivonne López Bayghen Patiño.

Agradecimientos

Al CINVESTAV por permitirme realizar mis estudios de postgrado y a CONACYT por la beca otorgada.

Al Dr. Arnulfo Albores Medina y la Dra. Esther López-Bayghen Patiño por toda su asesoría y apoyo incondicional durante todo este trabajo.

A los miembros de mi comité sinodal: Dra. Isabel Hernández Ochoa, Dr. Dr. José Alonso Fernández Guasti, Dr. Adolfo Sierra Santoyo, Dr. José Miguel Betancourt Rule por su invaluable apoyo, así como todas las observaciones para la mejora de mi proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio 7 por todo el apoyo para la realización de este proyecto así como la amistad brindada.

A la Q.B.F Patricia Vázquez Vázquez por su apoyo en la realización del cultivo celular.

A la Dra. Irais Poblete Naredo por su apoyo técnico y asesoría en técnicas de biología molecular.

A los integrantes del laboratorio 19, en especial Dra. Leticia Ramírez Martínez por su apoyo técnico y asesoría en técnicas de biología molecular, a la Ing. Lucero Cervantes Pozos por ayuda editorial.

A todos los profesores investigadores del Departamento de Toxicología por todos los conocimientos compartidos.

A la Coordinación académica por su invaluable apoyo en la finalización de este proyecto.

A la Lic. Lucina González de la Torre por todo el apoyo administrativo

Contenido

Agradecimientos	4
Índice de figuras y tablas	7
Resumen	9
Abstract.....	11
Abreviaturas.....	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Disruptores endocrinos: parabenos	14
1.1.1 Generalidades	14
1.1.2 Características	14
1.1.3 Fuentes de exposición humana.....	15
1.1.4 Toxicocinética	16
1.1.5 Efectos estrogénicos de los parabenos	17
1.2 Desarrollo folicular	20
1.2.1 Esteroidogénesis.....	22
1.4 Subpoblaciones de las células de la granulosa.....	25
1.4.1 Células de la granulosa en cultivo.....	27
1.5 Efectos de los parabenos en la esteroidogénesis femenina.....	28
1.6 Infertilidad	29
1.6.1 Aspectos toxicológicos en infertilidad	30
1.7 Justificación	31
1.8 Hipótesis	31
1.9 Objetivos.....	32
1.9.1 General	32
1.9.2 Particulares	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Estrategia experimental.....	33
2.2 Cultivo primario de células de la granulosa humana	34
2.1.2 Cultivo de células de la granulosa.....	35
2.1.3 Caracterización del fenotipo del cultivo primario de células de la granulosa.....	35

2.1.4	Funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo <i>in vitro</i> para evaluar el efecto de disruptores endocrinos.....	35
2.3	Caracterización de los efectos de los parabenos <i>in vitro</i>	36
2.3.1	Selección de las concentraciones empleadas de parabenos y bisfenol A.....	36
2.4	Tratamientos con xenobióticos	37
2.5	Extracción de RNA de células de la cúmula.....	38
2.5.1	Fundamento.....	38
2.5.2	Procedimiento.....	38
2.6	Análisis de la expresión de genes por medio de RT-PCR cuantitativa en tiempo real....	39
2.6.1	Fundamento.....	39
2.6.2	Procedimiento.....	39
2.7	Cuantificación de la producción hormonal	40
2.7.1	Fundamento.....	40
2.7.2	Procedimiento.....	41
2.8	Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT.....	41
2.8.1	Principio	41
2.8.2	Procedimiento.....	41
2.9	Análisis estadístico	41
3	RESULTADOS	43
3.1	Establecimiento del cultivo primario de células de la granulosa humana	43
3.2	Caracterización del cultivo primario de células de la granulosa.....	44
3.2.1	Marcadores génicos.....	44
3.2.2	Producción hormonal	46
3.3	Evaluación de la funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo <i>in vitro</i> para evaluar el efecto de disruptores endocrinos.....	47
3.4	Efectos de los parabenos <i>in vitro</i>	50
3.4.1	Citotoxicidad	52
3.4.2	Efecto de los parabenos sobre la expresión de enzimas esteroideogénicas	52
3.4.3	Efecto de los parabenos y BPA sobre la producción de progesterona y estradiol en cultivo.....	55
4	DISCUSIÓN.....	57
4.1	Cultivo primario de células de la granulosa humana	57
4.2	Caracterización del cultivo primario de células de la granulosa.....	61

4.3 Funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo in vitro para analizar el efecto de disruptores endocrinos con carácter estrogénico.....	62
4.4 Efecto de los parabenos y BPA sobre la esteroidogénesis en células de la granulosa humana.....	64
5. CONCLUSIONES.....	68
6. PERSPECTIVAS	68
7. BIBLIOGRAFÍA	69
8. ANEXO 1	72
Artículo publicado.....	72

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Desarrollo folicular	21
Figura 2. Vías Delta 5-3 y Delta 4-3 de esteroidogénesis	23
Figura 3. Esteroidogénesis ovárica.....	24
Tabla 1. Marcadores génicos de células de la granulosa, cúmula y mural.....	26
Tabla 2. Propiedades esteroidogénicas de las líneas celulares de granulosa humana	28
Tabla 3. Concentraciones seleccionadas de parabenos y bisfenol A.....	37
Tabla 4. Condiciones de la PCR-tiempo real	39
Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en RT-PCR	40
Figura 4. Viabilidad de las células de la granulosa en cultivo.	43
Figura 5. Células de la granulosa en cultivo de un “pool” de pacientes y donantes sometidas a estimulación ovárica controlada.....	44
Figura 6. Expresión de marcadores de células de la granulosa.	45
Figura 7. Expresión de marcadores de células de la cúmula y de células murales en el cultivo primario.	46
Figura 8. Producción de Progesterona y Estradiol.	47
Figura 9. Efecto del dietilestilbestrol sobre la producción de progesterona y estradiol.....	48
Figura 10. Efecto del DES sobre la expresión de enzimas esteroidogénicas relacionadas con la síntesis de progesterona.....	49

Figura 11. Efecto del dietilestilbestrol sobre la expresión de enzimas esteroidogénesis relacionados con la síntesis de estradiol.....	49
Figura 12. Efecto del BPA sobre la producción de progesterona y estradiol.....	50
Figura 13. Efecto del BPA sobre la expresión de enzimas esteroidogénicas.....	51
Figura 14. Esquema de tratamiento	51
Figura 15. Efecto de los parabenos y bisfenol A sobre la viabilidad celular.	53
Figura 16. Efecto del metil-parabeno en los genes relacionados con la esteroidogénesis.	53
Figura 17. Efecto del butil-parabeno en los genes relacionados con la esteroidogénesis.	54
Figura 18. Efecto del bisfenol A en los genes relacionados con la esteroidogénesis.....	54
Figura 19. Efecto de metil-parabeno y butil-parabeno sobre la producción hormonal.	55
Figura 20. Efecto del BPA sobre la producción hormonal.....	56
Figura 21. Presencia de DE en líquido folicular.....	58
Tabla 5. Evaluación de DE en cultivo primario de células de la granulosa	59
Figura 22. Diferenciación de las células de la cúmula a células murales.....	62

Resumen

Los parabenos son un grupo de compuestos derivados del ácido 4-hidroxibenzoico utilizados ampliamente como conservadores en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. Estos compuestos son conservadores de primera elección en la industria porque son baratos, fáciles de producir, inodoros, incoloros, estables en un amplio espectro de pH y presumiblemente de baja toxicidad. En 2004, Darbre encontró parabenos en 18 muestras de tejido mamario canceroso y abrió el debate acerca de la capacidad de los parabenos para actuar como disruptores endocrinos. Hay diversos estudios sobre el efecto de los parabenos tanto en animales como en humanos, sin embargo, los resultados no son concluyentes. El efecto de los parabenos sobre el sistema reproductor femenino es particularmente importante puesto que las mujeres son las principales consumidoras de productos que contienen este tipo de conservadores y puede asociarse al incremento de casos de mujeres con problemas de fertilidad. En la actualidad ya hay diversas tecnologías que ayudan a concebir un embarazo exitoso como la fertilización *in vitro*; a partir de esta técnica se pueden obtener varios ovocitos en un sólo ciclo y con ellos las células de la granulosa que pueden ser útiles para evaluar el efecto de posibles disruptores endocrinos. En este trabajo nos propusimos: 1) establecer un cultivo primario de células de la granulosa humana, 2) caracterizar este cultivo primario, 3) evaluar la funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo *in vitro* para analizar el efecto de disruptores endocrinos y 4) evaluar el efecto de los parabenos y bisfenol A sobre la esteroidogénesis en el cultivo primario. En este trabajo se establecieron las condiciones de transporte y cultivo de las células de la granulosa obtenidas a partir de mujeres donantes y pacientes de Instituto Ingenu, de tal forma que empleamos la expresión de genes característicos de ambas subpoblaciones de células de la granulosa: cúmulo (*Ptgs2*, *Pfklp*) y murales (*Cyp11a1*, *Lhcgr*), los perfiles transcripcionales las identificaron como células murales. Asimismo, se evaluó la producción hormonal (progesterona y estradiol) observando una producción de estradiol estable y una producción de progesterona que aumenta con respecto al tiempo en cultivo. Con lo anterior concluimos que nuestro modelo corresponde a un cultivo de células murales luteinizadas, siendo la esteroidogénesis su función más relevante, y con ello evaluar la funcionalidad del cultivo primario como un modelo para estudiar el efecto de los disruptores endocrinos, se empleó al dietilestilbestrol (DES) como un compuesto estrogénico (expresión de

enzimas esteroideogénicas y producción hormonal). El cultivo primario es sensible al efecto del DES sobre la esteroideogénesis y podemos concluir que nuestro cultivo primario de células murales luteinizadas es un buen modelo para evaluar la capacidad de un compuesto para alterar la esteroideogénesis. Con respecto al efecto de los parabenos y el bisfenol A, no encontramos ningún citotóxico ni sobre la esteroideogénesis. Aun cuando se emplearon concentraciones de relevancia fisiológica y superiores, no registramos efecto sobre la viabilidad celular, la expresión de las enzimas y la producción hormonal.

En conclusión, establecimos y caracterizamos un sistema de cultivo de células murales luteinizadas, que corresponde en comportamiento hormonal y expresión génica a las células murales que pavimentan el interior del folículo y mantienen la producción hormonal. Estas son las células que están en contacto con el líquido folicular, el cual es un trasudado de suero que puede contener tóxicos. En este cultivo la producción de progesterona y estradiol no se afectan tras la exposición a parabenos y bisfenol A, aunque sí hay una clara interrupción de la producción de progesterona con DES.

Abstract

Parabens are a group of compounds derived from 4-hydroxybenzoic acid that are widely used as preservatives in the cosmetics, pharmaceuticals, and food. These compounds are the conservatives of choice in the industry because they are cheap, easy to produce, odorless, colorless, stable in a broad pH spectrum, and low in toxicity. In 2004, a study by Darbre was alarming; they found the presence of parabens in samples of breast cancer opening the debate on whether parabens may act as endocrine disruptors. There are several studies on the effect of parabens in both animals and humans. However, the results are inconclusive. The effect of parabens on the female reproductive system is particularly significant because women are the primary consumers of products containing this type of preservatives, and because of the increase in cases of women with infertility. Currently, there are several technologies that help to conceive a successful pregnancy as in vitro fertilization; with this technique, several oocytes can be obtained in a single cycle together with granulosa cells that can be useful to evaluate the effect of these compounds. In this work we proposed: 1) to establish a primary culture of human granulosa cells, 2) to characterize this primary culture, 3) to evaluate the functionality of the primary culture of human granulosa cells as an *in vitro* model to analyze the effect of endocrine disruptors, and 4) to evaluate the effect of parabens and bisphenol A on steroidogenesis in the primary culture. We established the conditions of transport and culture of the granulosa cells obtained from women donors and patients of the “Instituto Ingenes”; we used the expression of characteristic genes of both subpopulations of granulosa cells: cumulus (*PTGS2*, *HAS2*) and mural (*Cyp11a1*, *LHCGR*), the transcriptional profiles showed that they were mural cells. In addition, the hormone production (progesterone and estradiol) was evaluated and, notably, estradiol production was stable while progesterone production increased with respect to time. With these findings, we conclude of that our model corresponds to luteinized mural cells, and that steroidogenesis is one crucial function to evaluate the functionality of the primary culture as a model to study the effect of endocrine disruptors, Diethylstilbestrol (DES) was used as a prototype estrogenic compound (for the expression of steroidogenic enzymes and hormonal production). The primary culture is sensitive to the effect of DES on steroidogenesis and we concluded that our primary culture of luteinized mural cells is a useful model to evaluate the capacity of a compound to alter the process of steroidogenesis. Regarding the effect of parabens

and bisphenol A, we did not find effects on cytotoxicity or on steroidogenesis, even at physiological concentrations or higher, we did not have an effect on cell viability, expression of enzymes and hormonal production.

In conclusion, a luteinized cell culture system was established and characterized, which corresponds in hormonal behavior and gene expression to the cells that cover the interior of the follicle and maintain the hormonal production. These are the cells that are in contact with the follicular fluid, transudate of serum that can contain toxic. In this culture, the production of progesterone and estradiol are not affected after exposure to parabens and bisphenol A, although there is an evident disruption of progesterone production with DES.

Abreviaturas

17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
RE	Receptor de estrógeno
MCF-7	Línea celular de adenocarcinoma de mama humana
qRT-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real cuantitativa
AR	Receptor de andrógenos
BMP	Proteína morfogenética ósea
BPA	Bisfenol A
cAMP	Adenosin mono fosfato cíclico
CG	Células de la granulosa
COC	Complejo ovocito-cumulus
CYP11A1	Citocromo P450 familia 11 Subfamilia A Miembro 1
CYP19A1	Citocromo P450 familia 19 subfamilia miembro 1
DE	Disruptor endocrino
DEHP	Di (2-etilhexil) ftalato
DES	Dietilestilbestrol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dicloro difenil tricloroetano
ELFA	Ensayo de fluorescencia unida a enzimas
FSH	Hormona folículo estimulante
GDF9	Factor de diferenciación de crecimiento 9
HAS2	Hialuronona sintasa 2
Kitl	Capa de transporte independiente del kernel
LH	Hormona luteinizante
LHCGR	Receptor de la hormona luteinizante
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Tampón de fosfato salino
PTGS2	Prostaglandina sintasa endoperoxidasa 2
RMP	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
VCAN	Versican
E2	Estradiol
T4	Testosterona
P4	Progesterona

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Disruptores endocrinos: parabenos

1.1.1 Generalidades

Los parabenos son una serie homóloga del grupo del ácido hidroxibenzoico, esterificado en la posición C-4 (incluyendo metil-, etil-, propil-, butil-, heptil- y benzil-parabeno), usados solos o en combinación para ejercer un efecto antimicrobiano. Fueron usados por primera vez como conservantes antimicrobianos en productos farmacéuticos a mediados de la década de 1920. Los parabenos han demostrado ser agentes antimicrobianos muy eficaces por lo que han sido ampliamente utilizados. A medida que aumenta la longitud de la cadena del grupo éster, la actividad antimicrobiana incrementa, pero la solubilidad en agua disminuye.

Generalmente, la replicación microbiana ocurre en agua, por lo que la cantidad de parabeno disuelto determina su habilidad preservativa. Como resultado, generalmente los parabenos con el grupo éster pequeño (metil- y propil-) son seleccionados para su uso como preservativos en alimentos. Los parabenos cumplen con varios de los criterios de un conservador ideal, poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, son seguros de usar (es decir, relativamente no irritantes, no sensibilizantes y de baja toxicidad), son estables en un amplio rango de pH y son suficientemente solubles en agua para tener una concentración eficaz (Labat, Kummer, Dallet, & Dubost, 2000; Soni, Carabin, & Burdock, 2005).

1.1.2 Características

Los parabenos son ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico, sólo difiriendo en el grupo éster, el cual puede ser el grupo metil-, etil-, propil- o butil-. Estos grupos éster resultan en la formación de metil-parabeno (CAS 99-76-3), etilparabeno (CAS 120-47-8), propil-parabeno (CAS 94-13-3) o butil-parabeno (CAS 94-26-8). Los parabenos más frecuentemente usados son: metil-parabeno y propil-parabeno (Darbre & Havey, 2014).

En forma pura, los parabenos son generalmente pequeños cristales transparentes o polvos cristalinos prácticamente sin olor o sabor, son de naturaleza higroscópica y tienen un alto coeficiente de reparto. Los parabenos son preparados por esterificación del ácido *p*-hidroxibenzoico con el correspondiente alcohol en presencia de un catalizador ácido.

Generalmente, los parabenos son estables en el aire y son resistentes a la hidrólisis en agua (caliente o fría) y en soluciones ácidas. El incremento en la longitud de la cadena alquílica de los parabenos incrementa su resistencia a la hidrólisis (Soni et al., 2005).

1.1.3 Fuentes de exposición humana

Debido a sus propiedades antimicrobianas, los parabenos son usados como conservadores en una amplia gama de productos de consumo a los cuales la población está expuesta, incluidos los productos para el cuidado personal, alimentos y productos farmacéuticos.

Basados en concentración de parabenos medidos en alimentos y en la tasa de ingestión diaria per cápita de alimentos, se ha calculado una ingesta diaria de parabenos totales en los Estados Unidos de 940, 879, 470 y 3017 ng (kg de peso corporal) en un día para bebés, niños pequeños, niños y adultos respectivamente (Liao & Kannan, 2014). Basado en la cantidad y frecuencia del uso de productos de cuidado personal y las mediciones de parabenos en los productos, la dosis total de parabenos por aplicación dérmica es de 31 μg (kg de peso corporal) al día para mujeres adultas y de 58.6 y 766 μg (kg de peso corporal) al día para bebés y niños pequeños respectivamente, lo que sugiere que la exposición a través de productos de cuidado personal aplicados dérmicamente puede ser sustancial (Blanchard, Hidy, Tanenbaum, Edgerton, & Hartsell, 2013).

Sin embargo, su uso como conservadores efectivos ahora se extiende a otras aplicaciones, incluyendo la preservación de productos de papel por lo que su manipulación no puede ser ignorada como otra fuente de exposición (Liao & Kannan, 2014). Además de la exposición de productos identificables, los parabenos se están distribuyendo de forma ubicua a través del aire interior haciendo que los lugares no ventilados sean otra fuente relevante de exposición (Weschler & Nazaroff, 2014).

También los frutos y vegetales pueden constituir otra fuente de exposición de parabenos, pues se ha detectado la presencia de estos compuestos intactos y de su metabolito común, el ácido *p*-hidroxibenzóico. Es muy probable que los parabenos intactos en frutos y vegetales se deban al procesamiento comercial del material o a la absorción de los parabenos a través del suelo

fertilizado con biosólidos municipales y/o el agua de riego contaminados por el extensivo uso de estos compuestos en diversos productos de uso personal (Sabourin et al., 2012).

1.1.4 Toxicocinética

La absorción de los parabenos depende de la vía de exposición; en el caso de la exposición oral, éstos son absorbidos en el tracto gastrointestinal mientras que, en el caso de la exposición dérmica, la entrada de los parabenos es través de la piel y depende de la longitud de la cadena alquílica y la formulación. En general, la permeabilidad de la piel a estos compuestos disminuye con el incremento de la cadena alquílica.

Una vez que llegan a la sangre, éstos pueden distribuirse a los diferentes órganos debido a su capacidad de unirse a la albúmina sérica en donde la constante de unión a albúmina incrementa con la longitud de la cadena alquílica de los parabenos. La unión de algunos fármacos o moléculas a proteínas plasmáticas es un factor importante de su disponibilidad y transporte en el cuerpo (Jun, Mayer, Himel, & Luzzi, 1971), por lo que los parabenos al poseer esta propiedad pueden ser capaces de distribuirse ampliamente en el cuerpo, sin embargo, antes de llegar a sangre, los parabenos pueden ser rápidamente hidrolizados por esterasas presentes en piel o intestino por lo que las concentraciones de los compuestos intactos que llegan a órganos blancos es baja (Soni et al., 2005).

Estudios con perros administrados intravenosamente con 100 mg/kg/día con metil-, propil- y butil-parabeno han mostrado que estos compuestos, pueden ser recuperados sin modificación en el cerebro, bazo y páncreas, y que altos niveles de metabolitos fueron extraídos en el hígado y el riñón (Soni et al., 2005). La medición de parabenos en tejido de cáncer de mama, sugiere que al menos una parte de los compuestos presentes en cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos pueden absorberse y retenerse en el cuerpo sin ser metabolizados (Jones, Thigpen, Morrison, & Richardson, 1956; Darbre & Havey, 2014).

Los parabenos son metabolizados al ácido *p*-hidroxibenzóico por esterasas presentes en la piel o intestino (metabolismo de fase I) o conjugados con glicina, sulfato o ácido glucorónico (metabolismo de fase II) en el hígado. Los parabenos que son aplicados dérmicamente son metabolizados por esterasas epiteliales, sin embargo el metabolismo en la piel es menor

comparado con el hígado (Sandanger et al., 2011). La disminución del metabolismo de los parabenos es importante, pues son los parabenos intactos principalmente los que ejercen los efectos estrogénicos. En un estudio utilizando dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y ZR-75-1), el ácido *p*-hidroxibenzoico fue capaz de desplazar al 17β -Estradiol (E2) del RE citosólico presente en estas líneas celulares en un 54% a una concentración de 5×10^6 M, además, fue capaz de incrementar la expresión de un gen reportero sensible a estrógenos (ERE-CAT) en la línea celular MCF-7 después de 24 h y 7 días, acción que se inhibió por el anti-estrógeno, ICI 182 780. La proliferación celular en ambas líneas celulares incrementó después del tratamiento con el ácido *p*-hidroxibenzoico. En este mismo estudio se comparó la actividad estrogénica del ácido *p*-hidroxibenzoico con metilparabeno, que es el parabeno de cadena alquílica más corta, observando que la capacidad de unión al receptor de estrógenos (RE) del ácido *p*-hidroxibenzoico fue similar al de metilparabeno, pero la actividad estrogénica sobre la expresión génica y proliferación celular fue menor que la de metilparabeno, de estos datos se puede concluir que los parabenos intactos son los que tienen un efecto estrogénico (Pugazhendhi, Pope, & Darbre, 2005).

Se investigó el metabolismo de metil-parabeno en conejos administrados con una dosis única de 0.4 o 0.8 g/kg por sonda gástrica. El 39% de la dosis administrada de metil-parabeno fue excretado con ácido *p*-hidroxibenzoico no conjugado, mientras que el resto fue eliminado como ácido *p*-hidroxibenzoico conjugado, en donde el principal producto conjugado fue con glicina (15%) o con ácido glucurónico (7% de éster y 15% de éter) y ácido sulfúrico (10%). La excreción urinaria de los metabolitos fue rápida, el 86% del compuesto fue eliminado en 24 h. Sin embargo, con el incremento de la longitud de la cadena alquílica, la excreción urinaria del ácido *p*-hidroxibenzoico disminuye (Soni et al., 2005).

1.1.5 Efectos estrogénicos de los parabenos

A pesar de que los parabenos se consideran como conservadores seguros, diversos estudios han mostrado que su exposición puede modular o alterar el sistema endócrino y por lo tanto, puede tener consecuencias perjudiciales para la salud humana.

Todos los parabenos usados en diversos productos han mostrado poseer actividad estrogénica tanto en sistemas *in vitro* e *in vivo*. La actividad estrogénica de los parabenos se incrementa

directamente con el tamaño de la cadena alquílica. Además, el metabolito ácido *p*-hidroxibenzóico (PHBA) también posee actividad estrogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (Banerjee, Chambliss, Mineo, & Shaul, 2014).

En 1998 se dio a conocer el primer artículo científico en mostrar que los parabenos poseen actividad estrogénica. Los estrógenos actúan en células blanco uniéndose al RE que funcionan como un mecanismo genómico de factores de transcripción activados por ligando para influir en los patrones de expresión génica o a través de mecanismos no genómicos por medio de la interacción con factores de crecimiento para la activación de vías de señalización (Banerjee, Chambliss, Mineo, & Shaul, 2014).

En el mecanismo genómico, las hormonas atraviesan la membrana celular por difusión simple y se une a sus receptores que se encuentran principalmente en el citoplasma asociados con proteínas de choque térmico (HSP90, HSP70 y HSP56). La unión con el ligando provoca un cambio estructural en el receptor que permite la disociación de las HSPs que activa al receptor y se trasloca al núcleo donde tiene alta afinidad por secuencias específicas en el DNA llamados elementos de respuesta hormonal (HRE). Una vez unido al HRE el complejo receptor-ligando facilita el ensamblaje y estabilización del complejo de pre-iniciación de la transcripción en los promotores de genes regulados por hormonas. Además, el receptor unido al ligando puede reclutar coactivadores de receptores a hormonas esteroideas por medio del dominio E. Estos coactivadores favorecen la modificación de la estructura de la cromatina para facilitar la movilización de la RNA polimerasa II hacia la secuencia promotora (Banerjee et al., 2014; Razandi, Pedram, Greene, & Levin, 1999).

En cuanto al mecanismo no genómico, este inicia en la membrana o en el citoplasma. En células de ovario de hámster chino (CHO) en las que se han expresado los receptores clásicos a estrógenos, se ha demostrado que estos se encuentran localizados en la membrana plasmática y que son capaces de estimular vías de transducción de señales después de la activación de proteínas G, dando así lugar a la activación de la fosfolipasa C y la adenilato ciclasa, que incrementa los niveles intracelulares de segundos mensajeros como: inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y adenosin 5-monofosfato cíclico (cAMP), respectivamente (Banerjee et al., 2014; Razandi et al., 1999).

Ensayos en sistemas *in vitro* han mostrado que los parabenos pueden unirse al RE en estudios de unión competitiva, que influyen en la expresión de genes regulados por estrógenos, tal como calbindina-D9k (CaBP-9k) (Ahn et al., 2012) y en el aumento de la proliferación de células MCF-7 dependientes de estrógenos para su crecimiento. En cuanto a los estudios *in vivo*, el ensayo estándar para determinar la estrogenicidad de un compuesto es por medio del incremento del peso uterino en roedores inmaduros u ovariectomizados y es llamado ensayo uterotrópico. Estos estudios han mostrado que son necesarias dosis altas para que los parabenos produzcan un incremento en el peso uterino. Además, se encuentran diferencias de respuesta entre especies (ratones inmaduros son más sensibles que ratones ovariectomizados o ratas Wistar inmaduras) y entre rutas de administración (subcutánea, oral o tópica) (Lemini 2003). La afinidad de unión relativa de los parabenos al RE humano es de 10,000 a 1000,000 veces menor que el E2, pero esta afinidad se incrementa con la longitud de su cadena alquílica (Darbre, 2006).

Se ha debatido mucho sobre la denominación de los parabenos como estrógenos débiles debido a que, como se mencionó anteriormente, los parabenos tienen baja afinidad de unión relativa al RE comparándolos con el ligando endógeno E2. Sin embargo, a altas concentraciones los parabenos muestran respuesta tanto en ensayos celulares (aumento en la expresión de CaBP-9k y proliferación de células MFC-7) como en animales (incremento en el peso uterino) en la misma magnitud que E2. Esto demuestra que los parabenos a concentraciones suficientes, dan respuestas de un agonista total en las células (Boberg, Taxvig, Christiansen, & Hass, 2010; P. D. Darbre, 2006)

Con respecto a lo anterior, el papel de los estrógenos en el desarrollo de cáncer de mama ha sido bien documentado a través de estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales, así como la efectiva terapia endocrina que incluye: Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERM), Antagonistas Selectivos de los Receptores de Estrógeno (ASRE), inhibidores de la aromatasas y agonistas de la LHRH que reducen el crecimiento del tumor (Lonning, 2004a, 2004b; Reinbolt et al., 2015), por lo que la presencia de altos niveles de estrógeno se ha asociado con un mal pronóstico de cáncer de mama (Darbre & Havey, 2014).

Debido a que la incidencia de cáncer de mama sensible a estrógenos es más alta en mujeres postmenopáusicas quienes poseen reducida síntesis endógena de estrógenos por parte del ovario,

surge la pregunta sobre cuál es la fuente exógena de estrógenos que promueve la incidencia de este tipo de cáncer sensible a estrógenos (Darbre & Havey, 2014). A este respecto, un estudio mostró la presencia de parabenos en tejidos de cáncer de mama procedentes de mujeres, lo que ha dado inicio a una controversia respecto a su uso en cosméticos y la incidencia de cáncer de mama (Harvey & Everett, 2004).

1.2 Desarrollo folicular

Los folículos son la unidad funcional del ovario; cada folículo consiste de un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas llamadas células de la granulosa. El ovocito y las células de la granulosa que lo rodean están separados del tejido intersticial por una membrana llamada lámina basal (Oktem & Oktay, 2008).

Los folículos primordiales están formados por oocitos en fase de diploteno y rodeados de una capa de células de la granulosa aplanadas. La formación del folículo primordial confiere un papel protector frente a los fenómenos de atresia celular. Los primeros folículos primordiales aparecen en el ser humano aproximadamente en la semana 15 de gestación y la vida fértil de una mujer estará determinada por el número de folículos primordiales presentes en el ovario. Estos folículos permanecerán en un estadio de “hibernación” hasta su reclutamiento para el crecimiento folicular (Maheshwari & Fowler, 2008).

Los folículos primarios se caracterizan por la pérdida de señales inhibitorias que mantienen “hibernando” a los folículos primordiales hasta su reclutamiento y la activación de señales estimulantes que favorecen la transición como BMP 4 (*Bone Morphogenetic Protein*) y 7, por lo que se permite el desarrollo de los folículos primarios. Las células de la granulosa de los folículos primordiales se transforman en células cuboidales, proliferan y forman de una a dos capas celulares incrementando el tamaño del folículo. Es importante señalar que el paso de folículo primordial a primario, no está mediado por hormonas como la FSH (por sus siglas en inglés *Follicle Stimulating Hormone*), pues los folículos primordiales aún no poseen receptores para FSH (Maheshwari & Fowler, 2008).

Los folículos pre-antrales tienen células de la granulosa que proliferan desde 1 a 2 capas en el folículo primario a múltiples capas en este estadio. Hay un incremento del tamaño del oocito,

hay formación de una lámina basal; la zona pelúcida y el folículo son rodeados por células derivadas del tejido conjuntivo ovárico denominadas teca (Oktem & Oktay, 2008).

El folículo antral se caracteriza por la presencia de un antro, que es una cavidad llena de líquido denominado “líquido folicular”. El folículo aumenta mucho de tamaño debido a la alta proliferación de las células de la granulosa y la teca, hay un incremento en la vascularización y tamaño del ovocito. En este estadio del desarrollo folicular la FSH juega un papel importante. Las células de la teca de la capa interna poseen receptores para la LH (por sus siglas en inglés *Luteinizing Hormone*) y son capaces de producir andrógenos que atraviesan las membranas hasta llegar a las células de la granulosa. La FSH en las células de la granulosa induce la síntesis de la enzima aromatasa, que se encarga de convertir los andrógenos procedentes de la teca en E2 y éste a su vez estimula la síntesis de receptores de LH en células de la granulosa. En esta etapa es donde se da la selección de un folículo dominante (Oktem & Oktay, 2008).

El folículo preovulatorio o de Graff se caracteriza por su gran tamaño comparado con el folículo antral, además, de que su oocito se localiza en un montículo de células de la granulosa denominado células de la cúmula. Los estrógenos producidos por los folículos antrales estimulan la secreción de FSH por parte de la hipófisis, la cual estimula el crecimiento a folículo preovulatorio. Este folículo es el que liberará al óvulo al ir recibiendo estímulos de la LH (Baerwald, Adams, & Pierson, 2003; Oktem & Oktay, 2008). En la figura 1 se esquematiza el desarrollo folicular.

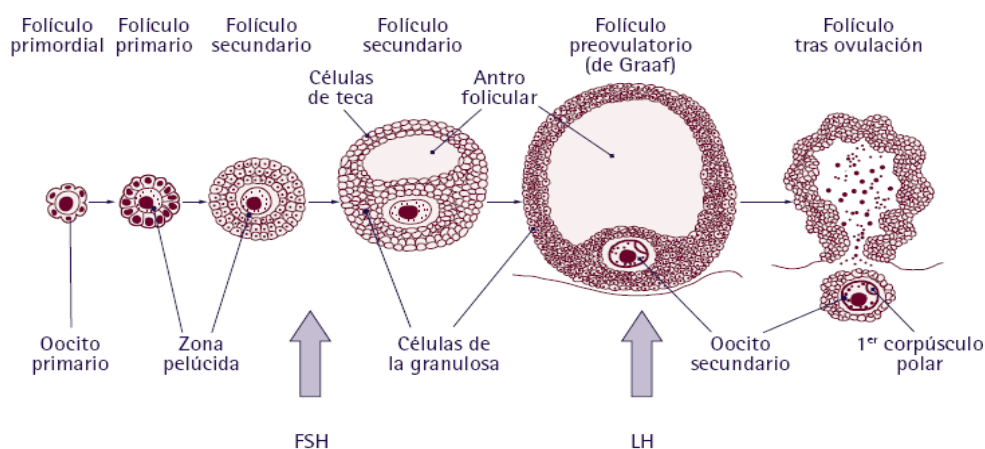


Figura 1. Desarrollo folicular.

(Tomado de Tratado de endocrinología pediátrica www.accessmedicina.com)

1.2.1 Esteroidogénesis

En términos generales podemos decir que la esteroidogénesis es el conjunto de reacciones metabólicas que hacen posible la producción de hormonas esteroideas. Este proceso no es selectivo para el ovario, algunas hormonas esteroideas son fabricadas a nivel de la corteza suprarrenal, sin embargo, son las células foliculares del ovario las que brindan el mejor sustrato y medio para poder convertir el colesterol en E2.

Las principales unidades funcionales del ovario para la síntesis de hormonas esteroideas son: los folículos maduros, cuerpo lúteo, folículos atrésicos y estroma ovárico.

La síntesis de las hormonas esteroideas puede llevarse por medio de dos vías: vía Delta 5 y vía Delta 4.

La vía delta 4 ($\Delta 4$) o de las cetonas (principal en el ovario): el doble enlace está en posición 4-5, y un grupo =O en C3. La pregnenolona se convierte en progesterona (P4) mediante dos fases enzimáticas que implican a las 3β -ol-deshidrogenasa y $\Delta 4$ -5-isomerasa, posteriormente la hidroxilación de la progesterona en el carbono 17 da lugar a la 17-hidroxiprogesterona. La acción de la 21-hidroxilasa sobre la P4 da lugar a la 11-desoxicorticosterona (11-DOCA) y la 11α -hidroxilasa sobre ésta da lugar a la corticosterona, que por una 18-hidroxilasa se convierte en 18-hidroxicorticosterona y por la 18-hidroxideshidrogenasa en aldosterona (mineralcorticoides). La acción de la 21-hidroxilasa sobre la 17-hidroxiprogesterona da lugar a 11-desoxicortisol y la 11α -hidroxilasa sobre éste da lugar al cortisol (glucocorticoides)]. La acción de la desmolasa convierte la 17-hidroxiprogesterona en androstendiona (19 C ð andrógeno). La acción de la 17β -ol-deshidrogenasa sobre la androstendiona da lugar a la testosterona (Fernández and Mangel 1983).

La vía delta 5 ($\Delta 5$) (principal en la suprarrenal): el doble enlace está en posición 5-6, y un grupo -OH en C3. La pregnenolona por hidroxilación en el carbono 17 se convierte en 17-hidroxi pregnenolona. Ésta desdobla su cadena lateral mediante una desmolasa convirtiéndose en la dehidroepiandrosterona (DHA). La acción de la 3β -ol-deshidrogenasa y a la $\Delta 4$ -5-isomerasa sobre la DHA da lugar a la androstendiona.

Por la 17β -ol-deshidrogenasa, de la androstendiona, obtenida por cualquiera de las vías anteriores, se obtiene la testosterona. La aromatización del anillo A de la androstendiona da lugar a la estrona y la aromatización de la testosterona da lugar al E2, como se puede observar en la figura 2 (Fernández and Mangel 1983).

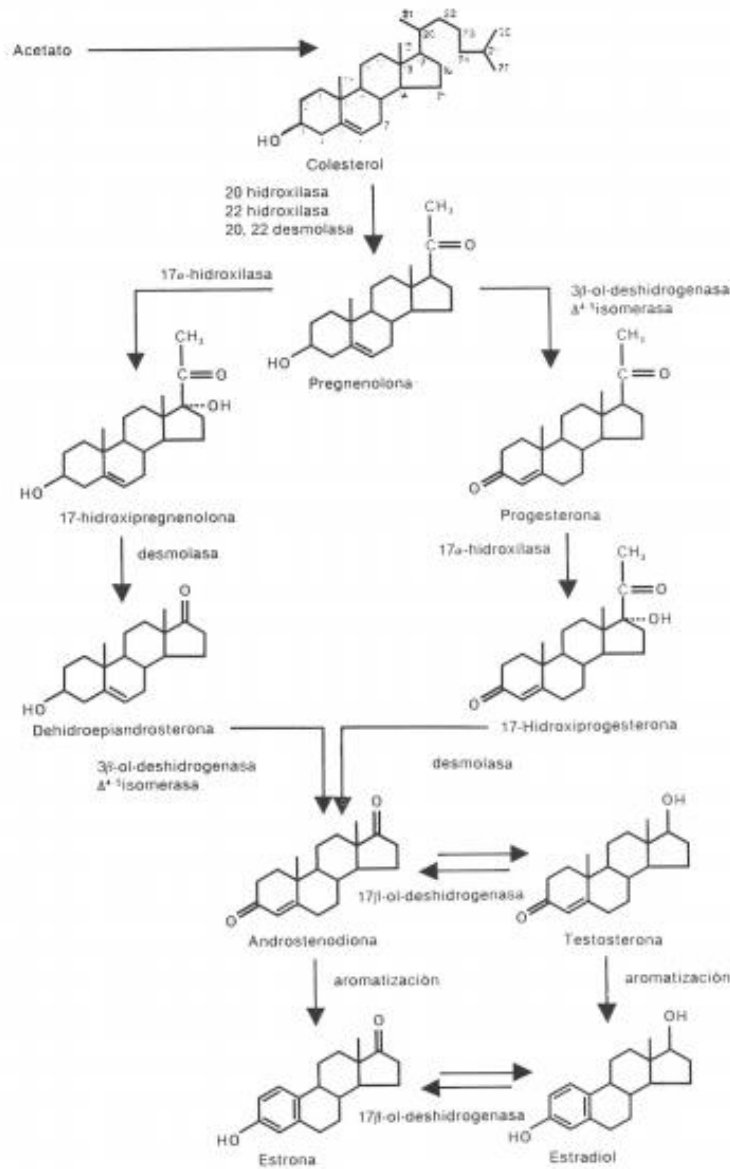


Figura 2. Vías Delta 5 y Delta 4 de esteroidogénesis.

(Tomada de [https://www.uv.es/~jvramire/apuntes/passats/reproduccio/TEMA%20R-01%20\(2000\).pdf](https://www.uv.es/~jvramire/apuntes/passats/reproduccio/TEMA%20R-01%20(2000).pdf))

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el E2 y la P4, las cuales son sintetizadas en los folículos preovulatorios. En el ser humano, la esteroidogénesis ovárica ocurre de acuerdo con la teoría de las dos células/dos gonadotropinas. La producción de E2 requiere de la síntesis de precursores androgénicos (androstenediona y testosterona) a partir del colesterol. Estos precursores son sintetizados por las células de la teca bajo la acción de la LH que favorece la expresión de las enzimas encargadas de producirlos. Los andrógenos sintetizados por la teca difunden hacia el compartimiento avascular de las células de la granulosa. A este nivel, los andrógenos son biotransformados a estrógenos por acción de la aromatasa (CYP19A1) que por acción de la FSH se ve favorecida su expresión. En la fase lútea, el compartimento ocupado por las células de la granulosa se vasculariza, permitiendo así el aporte de colesterol, aunado a un incremento en la expresión de enzimas esteroidogénicas que resulta en el aumento de la producción de estrógenos y P4 principalmente (Havelock, Rainey, & Carr, 2004). En la figura 3 se muestran las enzimas que participan en la síntesis de E2 y P4.

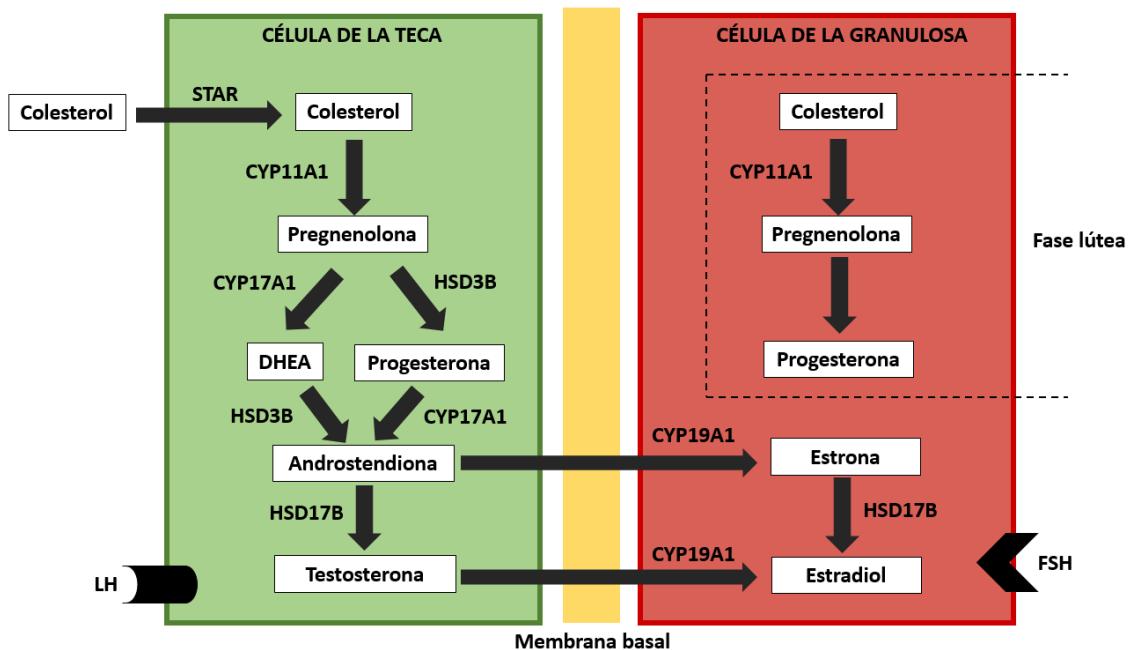


Figura 3. Esteroidogénesis en células de la granulosa y células de la Teca de folículos antrales.

Tomado y modificado de Havelock, Rainey et al. 2004

1.4 Subpoblaciones de las células de la granulosa

Durante el desarrollo folicular, las células de la granulosa (CG) pueden ser separadas en dos poblaciones con respecto a su proximidad con el ovocito. La formación del antro, que corresponde al final de la fase de crecimiento del ovocito y la formación del folículo pre-ovulatorio da lugar a que las células de la granulosa se diferencien en dos linajes anatómica y funcionalmente distintos, las CG mural y cúmula (Elvin et al., 1999).

Las CG murales están localizadas alrededor de la periferia del folículo y separadas del ovocito por el antro cuyas funciones son esteroideogénicas principalmente y las células de la cúmula son las que se encuentran rodeando al ovocito y formando una íntima asociación con él a través de unas proyecciones altamente especializadas que atraviesan la zona pelúcida; dando lugar a las uniones gap que ayudan al transporte de nutrientes tales como aminoácidos y sustratos para la producción de energía, ya que el ovocito es metabólicamente inactivo. Las células de la cúmula y ovocito forman una elaborada estructura llamada complejo ovocito-cúmulus (COC) (Elvin, Clark, Wang, Wolfman, & Matzuk, 1999; Gilchrist, Lane, & Thompson, 2008).

Estudios han demostrado que el ovocito juega un rol dominante en el establecimiento de la heterogeneidad de las células de la granulosa que se encuentran en el folículo pre-ovulatorio (células de la granulosa/células de la cúmula) por prevenir la diferenciación de las células de la cúmula. Se ha demostrado que el ovocito suprime la expresión del mRNA de *Lhr* y *CYP11A1*, conocidos como marcadores de diferenciación de estas células (Diaz, Wigglesworth, & Eppig, 2007; Baumgarten et al., 2014).

El efecto del ovocito sobre la heterogeneidad de las células de la granulosa, sugiere que el ovocito secreta factores que modulan la expresión y la eventual diferenciación celular (Eppig, 2001). Hay dos importantes factores secretados por el ovocito: factor de crecimiento de diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogénica de hueso 15 (BMP15). Debido a la ubicación de ambos linajes (cúmula/murales) dentro del folículo, la expresión de genes característicos de cada población de células de la granulosa depende del gradiente de los factores secretados por el ovocito, ya que las células más cercanas al ovocito promueve el desarrollo del fenotipo de las células de la cúmula y reprimiendo el fenotipo de mural, sin embargo, las células localizadas en

la periferia del folículo al estar más alejadas al ovocito, y por lo tanto, al gradiente de factores secretados por éste, se diferencian a murales (Elvin et al., 1999).

Diversos estudios han identificado genes que se expresan en cada subpoblación de las células de la granulosa, que si bien es cierto no solo se expresan en estas células en específico si no en muchos tipos celulares; para fines de este estudio sirven como marcadores de diferenciación de las células de la cúmula/mural (Tabla 1).

Tabla 1. Marcadores génicos de células de la granulosa, cúmula y mural

Marcadores de células de la granulosa		
Gen	Descripción y función	Referencia
<i>VCAN</i>	Versican. Proteoglicano que forma parte de la matriz extracelular de las células de la cúmula y también producida en células murales.	(Russell, Doyle, Ochsner, Sandy, & Richards, 2003; Russell, Ochsner, Hsieh, Mulders, & Richards, 2003)
<i>AR</i>	Receptor de Andrógenos. Media la acción de los andrógenos dentro del folículo.	(Yazawa et al., 2013)
Marcadores de células de la cúmula		
<i>PTGS2</i>	Prostaglandina sintasa endoperoxidasa 2. Procesos pro-inflamatorios previos a la ovulación. Participa en la expansión de células de la cúmula	(Diaz, Wigglesworth, & Eppig, 2007; Elvin et al., 1999)
<i>HAS2</i>	Hialuronona Sintasa 2. Síntesis de ácido hialurónico	(Sanchez, Adriaenssens, Romero, & Smitz, 2010)
Marcadores de células murales		
<i>LHCGR</i>	Receptor de la hormona luteinizante. Media la acción de la hormona luteinizante.	(Diaz, O'Brien, Wigglesworth, & Eppig, 2006; Fan, Savage, & Buckley, 2007)
<i>CYP11A1</i>	Citocromo P450, familia 11, subfamilia A, miembro 1. Enzima que corta la cadena lateral del colesterol	(Diaz et al., 2006; Elvin et al., 1999)

Como se mencionó anteriormente, los factores secretados por el ovocito no sólo regulan la expresión de transcritos característicos en células de la cúmula y murales, sino que también regulan su producción hormonal. Dichos factores al reprimir la expresión del gen *Lhcgr* en células de la cúmula, inhibe la producción de P4 (Gilchrist et al., 2008). Las células murales se caracterizan por su función esteroidogénica en donde la LH estimula a las células de la teca interna para que produzcan andrógenos aromatizables, los cuales son transportados a las células de la granulosa, para que sean convertidos en estrógenos por el CYP19A1. Por otro lado, la presencia de CYP11A1 cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona, promoviendo la producción de P4 (Lindeberg, Carlstrom, Ritvos, & Hovatta, 2007; Richards, Russell, Robker, Dajee, & Alliston, 1998)

1.4.1 Células de la granulosa en cultivo

Debido a que muchos estudios están dirigidos a entender los mecanismos de la esteroidogénesis y desarrollo folicular normal y anormal humano, un modelo de origen humano es de gran importancia. Se han realizado diversos estudios empleando líneas celulares de granulosa humana, las cuales han sido desarrolladas a través de varios métodos incluyendo inmortalización espontánea, transformación oncogénica y explantes de tumores.

Ya se han establecido diferentes líneas celulares de origen humano, las cuales han sido caracterizadas con respecto a su actividad esteroidogénica (síntesis de P4, actividad de la aromatasa y expresión de enzimas) y respuesta a gonadotropinas (sensibilidad a FSH y LG/CG) (Tabla 2). Sin embargo, las características de una línea celular cambian con el tiempo en cultivo o pasajes lo que puede causar limitaciones en los estudios. Recientemente se han empezado a utilizar cultivos primarios de células de la granulosa humana en donde la mayor fuente de obtención de estas células ha sido a través de pacientes sometidos a tratamientos de fertilización *in vitro* las cuales han servido como un nuevo modelo de estudio con la ventaja de ser células no modificadas, conservando sus características fisiológicas representando una ventaja respecto a las líneas celulares (Havelock et al., 2004).

Tabla 2. Propiedades esteroidogénicas de las líneas celulares de granulosa humana

Línea celular	Síntesis de progesterona	Actividad de la aromatasasa	Expresión de enzimas esteroidogénicas	Sensible a FSH	Sensible a LG/CG
HTOG	+	+	ND	ND	ND
COV434	+	+	-	+	-
KNG	+	+	-	+	-
HGL5	+	+	+	-	-
HO-23	+	ND	+	ND	-
Gcla	-	-	-	-	-
HGP53	+	ND	+	+	ND

ND: no detectado

1.5 Efectos de los parabenos en la esteroidogénesis femenina

En un estudio realizado en ratas neonatales administradas subcutáneamente con metil-, propil- y butil-parabeno (de manera individual) o E2 durante los días neonatales 1-7, se observó que los parabenos disminuyen el número de folículos primarios a altas dosis de propil-parabeno y butil-parabeno. También se evaluó la expresión de dos genes que participan en la esteroidogénesis (*StAR* y *CYP11A1*). *StAR* (Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda) participa en la translocación intramitocondrial del colesterol y *CYP11A1* enzima que se encarga de convertir el colesterol en pregnenolona, reacción inicial de la esteroidogénesis. Los resultados mostraron una disminución después del tratamiento de metil-, propil- y butil-parabeno de estos dos genes, alterando la fase inicial de la esteroidogénesis durante la etapa neonatal (Ahn et al., 2012).

En un estudio *in vitro* empleando un cultivo de folículos pre-antrales de rata y un cultivo primario de la granulosa humanas se analizó el efecto de butil-parabeno (10 nM a 10 μ M) y di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) a concentraciones de 1 a 100 nM, sobre el crecimiento folicular y la esteroidogénesis ovárica. Los resultados mostraron que ambos compuestos administrados

simultáneamente disminuyen la producción de E2. En el cultivo de células de la granulosa humana se observó que el DEHP disminuye la producción de P4 en el medio, y este efecto fue atenuado cuando butil-parabeno fue adicionado junto con el DEHP. Sugiriendo que el butil-parabeno y el DEHP actúan de manera aditiva en la disminución de la producción de E2 en el cultivo de folículos, mientras que, en las últimas etapas del desarrollo folicular, el butil-parabeno bloquea el efecto causado por el DEHP sobre la producción de P4 en el cultivo de células de la granulosa. Tomando en cuenta estos resultados, se sugiere que butil-parabeno y DEHP tienen efectos adversos sobre la esteroidogénesis desde el estado preantral hacia adelante y que los efectos de estos compuestos pueden ser modificables por co-exposición (Guerra, Furlong, Kempinas, & Foster, 2016).

Se ha determinado que los ftalatos alteran la esteroidogénesis por dos principales mecanismos: 1) la activación de receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR α ,y) en células de la granulosa inhibiendo la transcripción de la aromatasas y 2) inhibiendo los niveles de mRNA de las enzimas CYP19A1 Y CYP11A1 involucrados en la biosíntesis de E2 (Lovekamp-Swan et al., 2003; Hannon et al., 2015b).

1.6 Infertilidad

La infertilidad es definida como la incapacidad para concebir después de un año de relaciones sexuales sin protección, tiene una prevalencia global del 9%. Entre las parejas infértiles, se estima que la causa es predominantemente femenina en un 38% y principalmente masculina en un 20%, mientras que el 27% se debe tanto a anomalías masculinas y femeninas y el 15% se debe a causas desconocidas.

Han surgido numerosos estudios que han reportado un aumento en la disminución de la función reproductiva de todo el mundo. Debido al corto periodo de tiempo en el que ha surgido esta problemática, los cambios genéticos no pueden explicarlo. Por lo tanto, ha llamado la atención diversos contaminantes ambientales que pueden ser responsables de las tendencias observadas (Marques-Pinto & Carvalho, 2013).

1.6.1 Aspectos toxicológicos en infertilidad

Uno de los acontecimientos más significativos en el siglo pasado en el área de endocrinología fue el reconocimiento de que algunos compuestos presentes en el medio ambiente son capaces de alterar el sistema hormonal, por lo que fueron llamados como disruptores endocrinos (DE). El grupo de DE es extremadamente heterogéneo, abarca sustancias sintéticas usadas en la industria y sus sub-productos (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Su presencia en el entorno es ubicua y se han detectado diversos DE en fluidos biológicos humanos como suero, plasma seminal, líquido folicular, lo cual ha incrementado la preocupación de que la exposición a DE puede alterar la fertilidad humana y se han establecido diversos mecanismos por los cuales los DE pueden alterar la función reproductiva. La mayoría de los DE actúan como ligandos (agonistas o antagonistas) de receptores de membrana o intracelulares (tanto para hormonas esteroideas o no esteroideas), interfiriendo así en las vías de señalización celular reguladas por hormonas y en la expresión de genes. Algunos DE son capaces de alterar la biodisponibilidad hormonal al interferir con su secreción y transporte o interrumpir las vías enzimáticas implicadas en la síntesis o metabolismo hormonales (Marques-Pinto & Carvalho, 2013).

Hay compuestos químicos que son capaces de alterar la disponibilidad de las hormonas en el ovario como es el caso del pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), cuyos efectos en el sistema reproductor femenino han sido bien estudiados. Se ha demostrado que el DDT es capaz de bloquear la síntesis de P4 por medio de la disminución de cAMP y con ello la disminución de la expresión del mRNA del CYP11A1, enzima intermediaria en la síntesis de dicha hormona. Compuesto bien estudiado es el bisfenol A (BPA), el cual ha mostrado alterar la síntesis de P4 y E2 por alterar los niveles de mRNA de enzimas esteroideas, sin embargo, el mecanismo de acción aún se desconocen (Craig, Wang, & Flaws, 2011).

Otro compuesto estudiado ha sido el Dietilestilbestrol (DES), compuesto estrógeno potente que fue utilizado hace años para disminuir el riesgo de aborto en mujeres embarazadas y para tratar problemas de próstata, bien conocido por afectar el sistema reproductivo y muy usado para evaluar el potencial de varios químicos que afectan o mimetizan la actividad de los estrógenos (Warita *et al.*, 2010).

En la esteroidogénesis testicular, el DES causa una drástica disminución de los niveles de proteína y mRNA de CYP11A1 y StAR (Maeda *et al.*, 2013; Warita *et al.*, 2010). En ratas inmaduras expuestas a DES se observó una disminución en los niveles séricos de P4, E2 y testosterona (T4), así como una disminución en la expresión de CYP19A1 Y CYP17A1 (Imamichi *et al.*, 2017).

1.7 Justificación

Los parabenos son un grupo de compuestos derivados del ácido 4-hidroxibenzoico utilizados ampliamente como conservadores en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. En el 2004, el trabajo de Darbre causó alarma pues encontró parabenos en tejidos de cáncer de mama abriendo el debate sobre la posibilidad de que los parabenos actúen como DE. Hay diversos estudios sobre el efecto de los parabenos tanto en animales y humanos. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora no son concluyentes, en algunos casos se observa efecto y en otros no. De gran interés es el efecto de los parabenos sobre las células foliculares puesto que las mujeres son las principales consumidoras de productos que contienen este tipo de conservadores y en nuestras manos se ha detectado la presencia de parabenos en líquido folicular (líquido que rodea las células foliculares). Por lo tanto, es necesario evaluar el efecto de los parabenos a concentraciones ya determinadas en fluidos biológicos sobre un cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo representativo de una de las principales funciones del sistema reproductor femenino.

1.8 Hipótesis

La exposición a parabenos alterará la esteroidogénesis de las células de la granulosa humana en cultivo primario

1.9 Objetivos

1.9.1 General

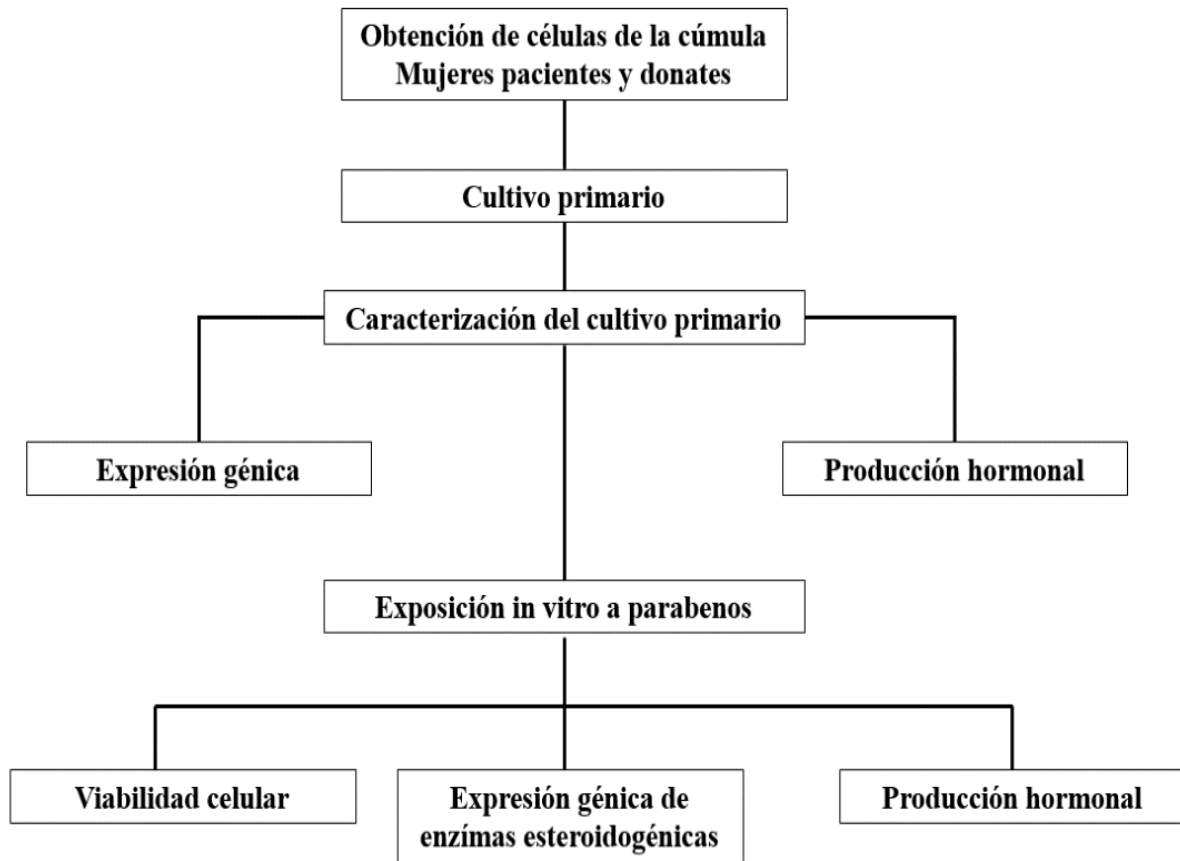
- Evaluar la actividad estrogénica de los parabenos en un cultivo primario de células de la granulosa humana

1.9.2 Particulares

- Establecer las condiciones necesarias para tener un cultivo primario de células de la granulosa humana
- Caracterizar el cultivo primario de células de la granulosa humana
- Evaluar la funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo *in vitro* para evaluar el efecto de disruptores endócrinos
- Evaluar el efecto de algunos parabenos como disruptores endócrinos en el cultivo primario de células de la granulosa humana

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia experimental



2.2 Cultivo primario de células de la granulosa humana

2.2.1 Estimulación Ovárica Controlada y recuperación del ovocito

Todas las pacientes (mujeres bajo tratamiento por infertilidad masculina) y donantes fueron sometidas a estimulación ovárica controlada durante 10 días, que consistió en una administración de dosis diaria de agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina [0.25 mg/día Cetorelix, Cetrotida ó 0.25 mg/día de acetato de Ganirelix] después de la menstruación.

Las gonadotropinas fueron administradas en dosis variables, con una dosis mínima diaria de 300 UI, con ajustes adicionales según la edad de la paciente, la capacidad de respuesta ovárica, los niveles séricos de E2 y el diámetro de los folículos por ultrasonido vaginal cada 2 o 3 días. La estimulación fue prolongada hasta obtener un diámetro de los folículos >18 mm. La hormona gonadotropina coriónica humana recombinante (Choragon 1000 UI) fue administrada, y la recuperación de los ovocitos se realizó 36 h más tarde guiado con ultrasonido. Todos los folículos de 14-18 mm fueron aspirados (típicamente de 6 a 18), y de cada paciente se obtuvieron entre 6 y 22 ovocitos (promedio: 17.5 ± 3.5 ovocitos por paciente).

2.2.2 Obtención de las células

El protocolo fue aprobado por el comité de Bioética de INGENES y para la recolección de las células se contó con la colaboración del Instituto Ingenu de la Ciudad de México, México. Las células recolectadas fueron células de la cúmula (células que se encuentran rodeando al ovocito) provenientes de folículos pre-ovulatorios. Después de la estimulación ovárica (estimulación de la producción de óvulos) y de la punción folicular (extracción de óvulos), las células de la cúmula fueron separadas del óvulo mecánicamente como parte de un proceso de preparación de los ovocitos para observar su grado de maduración. Las células de la cúmula provinieron de mujeres donadoras de óvulos y pacientes a quienes se les explicó el propósito del estudio, estuvieron de acuerdo y firmaron una carta de consentimiento informado. El protocolo de investigación del presente proyecto fue aprobado por el comité de ética de INGENES.

2.2.3 Transporte de células de la cúmula

Las células fueron transportadas de INGENES a CINVESTAV en medio DMEM-F12 (Gibco by Life Technologies # catálogo 12634-010) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina

(para evitar una posible proliferación bacteriana que causara una pérdida de este valioso material biológico), a una temperatura aproximada a los 37°C dentro de un recipiente térmico para conservar la temperatura.

2.1.2 Cultivo de células de la granulosa

Las células se lavaron dos veces con PBS 1X. Posteriormente, las células fueron tratadas con 150 µl de hialuronidasa (1 mg/ml) (Sigma Aldrich # catálogo H3506) para realizar la disgregación celular. Posteriormente se lavaron de nuevo con PBS 1X y se centrifugaron a 3,200 rpm durante 5 minutos (Centrífuga ADAMS Compact II, Becton Dickinson); la pastilla celular fue re-suspendida en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina. Se realizó el conteo celular en un hematocitómetro empleando azul de tripano (Sigma Aldrich # catálogo T8154). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de humedad relativa.

2.1.3 Caracterización del fenotipo del cultivo primario de células de la granulosa

Con base en la literatura, se seleccionaron genes característicos de ambas subpoblaciones de las células de la granulosa: cúmula (*PTGS2* y *PFKP*), mural (*CYP11A1* y *LHCGR*) y granulosa (*AR* y *VCAN*). Como complemento de la caracterización también evaluamos la producción hormonal de las células de la granulosa en cultivo, las hormonas que analizaron fueron P4 y E2. Para evaluar los marcadores génicos y hormonales; las células fueron monitoreadas durante el tiempo en cultivo. Se obtuvo RNA para evaluar los marcadores génicos al tiempo cero (previo al cultivo de las células), 18, 24 y 48 h de cultivo. Para la evaluación de la producción hormonal se obtuvo el medio de cultivo a las 18, 24 y 48 h de cultivo.

2.1.4 Funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo *in vitro* para evaluar el efecto de disruptores endocrinos

Para evaluar la sensibilidad del cultivo primario de células de la granulosa humana a los efectos de disruptores endocrinos, se empleó DES a una concentración de 5 µM con base a un estudio donde se observó la alteración de la síntesis de P4 y del mRNA de *CYP11A1* (Warita et al., 2010), además, se empleó BPA a una concentración de 4.3 y 43 µM con base a un estudio en cultivo de células de la granulosa humana en donde se observó una disminución en la producción

hormonal así como en la expresión de enzimas esteroideogénicas (Abdallah Mansur, 2016). El DES (MERCK # catálogo 500394) y BPA (Sigma-Aldrich, St. Louis. MO) fueron disueltos en DMSO (Sigma Aldrich # catálogo D4540) con una concentración final en cultivo de 0.5%. Después de 24 h de tratamiento, el medio de cultivo fue colectado y almacenado a -20°C hasta su uso para la medición de hormonas, mientras que las células fueron colectadas en Trizol (Sigma Aldrich TRI Reagent # catálogo T9424) y almacenadas a -70°C para la extracción de RNA.

2.3 Caracterización de los efectos de los parabenos *in vitro*

2.3.1 Selección de las concentraciones empleadas de parabenos y bisfenol A

Las concentraciones empleadas para evaluar el efecto de los parabenos fueron seleccionadas con base en las determinadas por otros autores en fluidos biológicos como suero y sangre (Sandanger, Huber et al. 2011, Vela-Soria, Ballesteros et al. 2013, Havey 2014, Jimenez-Diaz, Iribarne-Duran et al. 2016, Vandenberg, Hauser et al. 2007). Se decidió utilizar únicamente las concentraciones detectadas en estos fluidos debido a que el líquido folicular es un transudado del plasma sanguíneo y al no contar con datos disponibles en este fluido, estas concentraciones sirvieron de base para este estudio; adicionalmente, se incluyeron dos concentraciones muy por encima de las concentraciones detectadas en fluidos biológicos de cada uno de nuestros compuestos de interés. En la tabla 3 se muestran las concentraciones de parabenos determinadas en este tipo de fluidos y las que fueron seleccionadas para nuestro estudio. Se decidió emplear al BPA como un compuesto comparativo, ya que su capacidad como disruptor endócrino es conocida (Vandenberg, Hauser et al. 2007) y las concentraciones seleccionadas también se encuentran descritas en la literatura (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones seleccionadas de parabenos y bisfenol A.

Compuesto	Fluido	Concentraciones encontradas	Concentraciones seleccionadas	Referencia
Metil-parabeno	Suero Sangre de menstruación	6 nM 9.2 nM 18.4 nM 61.7 nM 300 nM	6 nM 300 nM 657 nM 1 μ M	Sandanger, Huber et al. 2011, Vela-Soria, Ballesteros et al. 2013, Havey 2014, Jimenez-Diaz, Iribarne-Duran et al. 2016
Butil-parabeno	Sangre de menstruación	2 nM 5.1 nM	2 nM 5.1 nM 20 nM 1 μ M	Sandanger, Huber et al. 2011,
Bisfenol A	Suero Líquido folicular	1.4 nM 2.8 nM 4.4 nM 4.6 nM 7 nM 8.7 nM	1.4 nM 8.7 nM 500nM 1 μ M	Vandenberg, Hauser et al. 2007

En rojo se indican la concentración más baja y más alta detectadas en fluidos biológicos y en azul una concentración alta seleccionada arbitrariamente y otra empleada en estudios *in vivo* e *in vitro*.

2.4 Tratamientos con xenobióticos

Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos (600,000 células vivas/pozo contadas en hematócrito) y cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina/estreptomina. Después de 21 h de cultivo, el medio fue remplazado por medio fresco con una disminución de suero al 1% de SFB (la disminución del porcentaje de SFB se realizó para disminuir la actividad celular y que el efecto de los compuestos no fuera opacado) y 1% de penicilina/estreptomina previo a los tratamientos con los compuestos de interés. Después de 3 h de la supresión celular por la disminución del porcentaje de SFB, se adicionó 1 μ M de testosterona junto con metil-parabeno ó butil-parabeno o BPA disueltos en DMSO (0.01%).

La testosterona (1 μ M) fue adicionada al cultivo de células de la granulosa como precursor para la síntesis de estrógeno, ya que de manera endógena los precursores de E2 son proporcionados por las células de la teca interna. Para excluir cualquier posible efecto del DMSO, un segundo control sin DMSO fue incluido. Las soluciones de trabajo fueron preparadas al momento de realizar cada experimento con la finalidad de evitar degradación de los compuestos por previas descongelaciones. La concentración de DMSO final en cultivo fue de 0.01%.

Después de 24 h de tratamiento, el medio de cultivo fue colectado y almacenado a -20°C hasta su uso para la medición de hormonas, mientras que las células fueron colectadas en Trizol y almacenadas a -70°C para la extracción de RNA.

2.5 Extracción de RNA de células de la cÚmula

2.5.1 Fundamento

La extracción de RNA de células de la cÚmula se realizó con el estuche Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research # catálogo R2050) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Es un estuche comercial para aislar RNA total de muestras en Trizol y otros reactivos con ayuda de la separación en columna (incluida en el estuche) y emplea el uso de DNasa I para evitar contaminaciones de DNA.

2.5.2 Procedimiento

La extracción de RNA de células de la cÚmula se realizó con el estuche Direct-zol RNA MiniPrep de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al término de los tratamientos, las células se lavaron con PBS 1X estéril. Posteriormente se retiró el PBS y se adicionaron 500 μl de Trizol por pozo. Las células se colocaron en tubos Eppendorf estériles y se adicionaron 500 μl de etanol (95-100%) y se mezclaron. La mezcla fue transferida a una columna colocada dentro de un tubo de recolección y se centrifugó a 12500 rpm durante 1 minuto a 4°C (Nota: todas las centrifugaciones se realizan a 12500 rpm a una temperatura de 4°C durante 1 minuto) eliminando el eluato. Enseguida se adicionó 400 μl de amortiguador de lavado a la columna y se centrifugó. Posteriormente se adicionó 80 μl de la mezcla (5 μl de DNase I y 75 μL de la solución tampón de digestión de DNA), se incubaron a temperatura ambiente ($20-30^{\circ}\text{C}$) en la oscuridad por 15 minutos. Transcurrida la incubación, se adicionó 400 μl de Direct-Zol RNA solución de prelavado a la columna y se centrifugó, se repite este último paso. En seguida se adicionaron 700 μl de solución amortiguadora de lavado y se centrifugó durante 2 minutos. Por último, se adicionó 30 μl de agua libre de DNasa/RNasa a la columna y se centrifugó y se recuperó el eluato. El RNA obtenido se cuantificó en el equipo de NanoDrop (NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

2.6 Análisis de la expresión de genes por medio de RT-PCR cuantitativa en tiempo real

2.6.1 Fundamento

El SYBR-Green I es el fluoróforo específico de DNA bicatenario más usado para determinaciones empleando la técnica de RT-PCR. Este fluoróforo se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. La detección con SYBR-Green I es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula, pero requiere de una implementación cuidadosa para que no amplificar productos inespecíficos que luego el fluoróforo detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados.

2.6.2 Procedimiento

El ensayo se hizo en un solo paso utilizando el KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR kit utilizando 5 ng de RNA total. Las condiciones de la PCR-tiempo real fueron las siguientes:

Tabla 4. Condiciones de la PCR-tiempo real

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Síntesis de DNA	42 °C	5 minutos	1
Inactivación de enzima RT	95 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	3 seg	40
Alineamiento/extensión	Determinado para cada oligo	30 seg	40
Disociación	Determinado por el equipo		

Se diseñaron iniciadores para humano de los genes de interés. Como control positivo y de carga se empleó hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). El análisis de expresión se determinó por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. En la Tabla 5 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados en este estudio.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en RT-PCR

Gen	Sentido	Antisentido
AR	CGATCCTTCACCAATGTCAA	CCACTGGAATAATGCTGAAG
VCAN	TCAGCAAAGGACAATTCAATA	TTTAAAATGTTTTGGGAGCA
PTGS2	GTTGACATCCAGATCACATTTG	TCCACAATCTCATTGAATCAGG
PFKP	AAATCAAAGAGCTTGTCTGTCAC	GTCGAACCGCATCTTGAAAT
CYP11A1	GCCTTTGAGTCCATCACTAAC	GAACACTTCCTTTCTGTCTCAA
LHR	AAGTTTCCAGATGTTACGAAG	CCTTTAGCTCCAGTGAAGTC
HPRT	GCCAGACTTTGTTGGATTTGA	AATAGGACTCCAGATGTTTCCA
CYP19A1	CCCGATACATTATAACATCACCA	CTTGAGGACTTGCTGATAATGAG
HSD-3β	GATGAGCCATTCCTGAAGAGA	ACTGGTGTAGATGAAGACTGG

2.7 Cuantificación de la producción hormonal

Para evaluar la producción hormonal y el efecto de cada tratamiento con los compuestos de interés, se recolectó el medio en los diferentes tiempos de cultivo (18, 24 y 48 h) y se almacenó a -20°C hasta su medición. Se empleó el estuche comercial VIDAS® Progesterona y VIDAS® Estradiol (BioMerieux # catálogo 30409).

2.7.1 Fundamento

El principio de este análisis asocia el método inmunoenzimático por competencia con una detección final en fluorescencia (ELFA). El cono de uso único sirve a la vez de fase sólida y de sistema de pipeteo. Los demás reactivos de la reacción inmunológica están listos para su empleo y previamente repartidos en el cartucho. En una primera fase, tras la dilución de la muestra, la P4 contenida en la misma se ligará al anticuerpo monoclonal específico fijado sobre el cono. Las etapas de lavado eliminan los componentes no fijados. En una segunda fase, el cono capta el conjugado. Se produce una saturación de los lugares que hayan quedado libres del anticuerpo en el conjugado. La P4 retenida se revela mediante el conjugado que es un derivado de la P4 marcado con fosfatasa alcalina. El conjugado no fijado se elimina mediante lavado. Durante la etapa final de revelación, el substrato (4-metil-umbeliferil-fosfato) se aspira y luego se descarga en el cono; la enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este substrato en un producto (4-metil-umbeliferona) cuya fluorescencia emitida se mide a 450 nm. El valor de la

señal de fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de P4 presente en la muestra.

2.7.2 Procedimiento

Los reactivos se llevan a temperatura ambiente 30 minutos antes de su uso, posteriormente se realiza la calibración del equipo empleando el calibrador y control proporcionados por el estuche. Una vez realizada la calibración, las muestras a analizar se homogenizan con la ayuda de un vortex y se diluyen a una proporción de 1:500 con suero masculino y se coloca 200 μ l de muestra en las tiras de reacción y se introducen al equipo (BioMerieux).

2.8 Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT

2.8.1 Principio

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5 dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1983).

2.8.2 Procedimiento

Después de cada tratamiento celular con cada uno de los xenobióticos, se agregó 10 μ l de MTT (5 mg/ml en PBS), por cada 100 μ l de medio. Después de 2 h de incubación con el reactivo, se adicionó 200 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazán, el cambio de coloración fue evaluado por densidad óptica utilizando un lector de placas Tecan M200 (Tecan, Infinitete M200), midiendo la absorbancia a 570 nm.

2.9 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm error estándar (S.E.). Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante ANOVA y un post-test de Dunnet. Los valores de $p < 0.05$ (dos colas)

se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se calcularon con el software Sigma Plot v.12.

3 RESULTADOS

3.1 Establecimiento del cultivo primario de células de la granulosa humana

La esteroidogénesis ovárica es crucial para la fertilidad. Hay múltiples estudios sobre el papel de los DE en modelos animales (Mlynarcikova et al., 2014), y para ahondar en los mecanismos moleculares es necesario evaluar el efecto de los compuestos de interés en un cultivo primario de células de la granulosa como un modelo representativo de una de las principales funciones del sistema reproductor femenino (esteroidogénesis).

Para el establecimiento del cultivo primario se partió de las células de la cúmula que rodean al ovocito obtenidas de mujeres donantes y pacientes sometidas a estimulación ovárica controlada en tratamientos de reproducción asistida. En cada cultivo independiente se trabajó con una mezcla de células procedentes de pacientes y donantes para reducir la variabilidad biológica inter-individual. Se evaluó la viabilidad de las células en cultivo (48 h de cultivo) observando que se mantuvieron vivas durante el tiempo de cultivo (Figura 4).

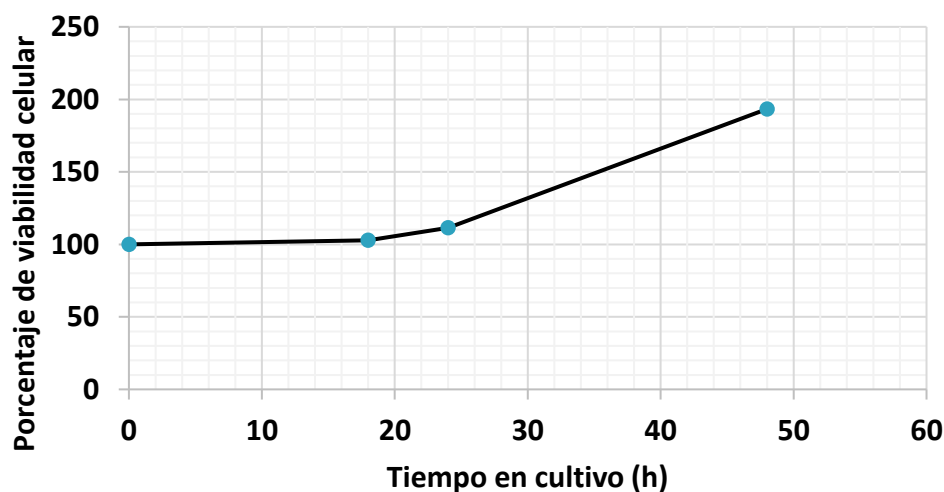


Figura 4. Porcentaje de viabilidad de las células de la granulosa en cultivo. Las células fueron cultivadas durante 18, 24 y 48 h y la viabilidad fue comparada con las células antes de ser cultivadas (0 h).

Las células mantuvieron una forma alargada que no cambió durante el tiempo de cultivo como se observa en la figura 5.

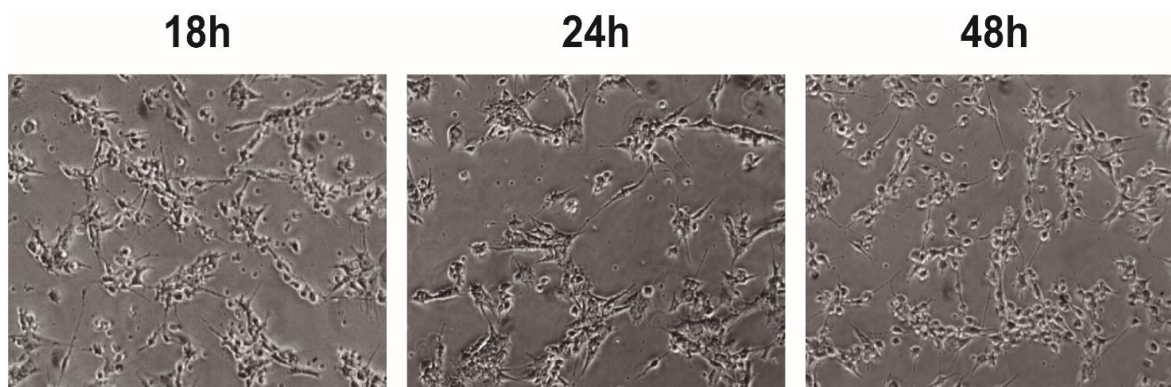


Figura 5. Apariencia de las células de la granulosa en cultivo de 18, 24 y 48 horas. Las células procedieron de un “pool” de pacientes y donantes sometidas a estimulación ovárica controlada. Las células fueron disgregadas con hialuronidasa y sembradas en placas de multipozos. La morfología a las 18, 24 y 48 h en cultivo se muestra en micrografías tomadas en el microscopio invertido (Nikon ECLIPSE TS100-F y cámara MA88-500 Premiere® mediante el software TSVIEW 7) (100 μ m).

3.2 Caracterización del cultivo primario de células de la granulosa

3.2.1 Marcadores génicos

Para caracterizar el fenotipo de las células de granulosa en cultivo, se detectaron y cuantificaron los transcritos característicos de las subpoblaciones de células de la granulosa: cúmula y murales. En primer lugar, se demostró que el cultivo corresponde a células de la granulosa, para lo cual se detectaron a VCAN y a AR, ambos característicos de este tipo celular, cuantificando su expresión a las 0 h (previo a ser cultivadas), 18, 24 y 48 h de cultivo.

Como se puede observar en la figura 6, la expresión de ambos genes se mantuvo constante desde el tiempo cero hasta las 48 h de cultivo, aunque se observan algunas fluctuaciones estas no son significativas. Lo anterior sugiere que el cultivo primario preserva sus características de células de la granulosa durante todo el tiempo en el que fueron monitoreadas.

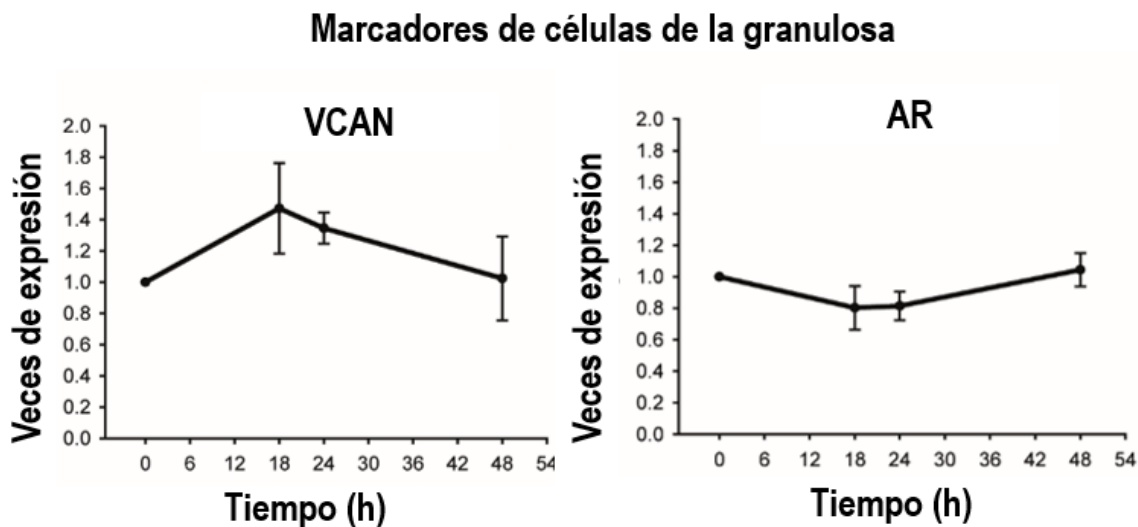


Figura 6. Expresión de VCAN y AR en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa en cultivo fueron cosechadas en Trizol a 0, 18, 24 y 48 h. Se obtuvo RNA total que fue analizado por qRT-PCR para VCAN y AR. Se usó HPRT como gen de referencia. Los datos se expresan de manera relativa con respecto al tiempo cero (células no cultivadas, pero sí tratadas con hialuronidasa). Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por una post test de Dunnet, $p < 0.05$.

Posteriormente, se evaluó la expresión de genes característicos de ambas subpoblaciones de las células de la granulosa: células de la cúmula (*Ptgs2* y *Has2*) y murales (*CYP11A1* y *Lhcgr*). Como se muestra en la figura 7, la expresión de *Ptgs2* disminuyó conforme transcurrió el tiempo de cultivo y resultó significativo desde las 18 h. Del mismo modo, la expresión de *Has2* disminuyó conforme aumentó el tiempo de cultivo de manera significativa. Con respecto a los marcadores de células murales, tanto *CYP11A1* y *Lhcgr* aumentaron su expresión de manera significativa con respecto al tiempo de cultivo. Los resultados anteriores indican que a las 24 h de cultivo, las células expresan marcadores de células murales y no expresan marcadores de células de la cúmula, por lo tanto, el cultivo corresponde a células murales. Lo anterior obedece al hecho de que la ausencia del ovocito y de los factores secretados por este (GDF9 y BMP15), promueve la expresión de genes característicos del fenotipo de células de la granulosa mural que inicialmente eran células de la cúmula (Eppig, 2001).

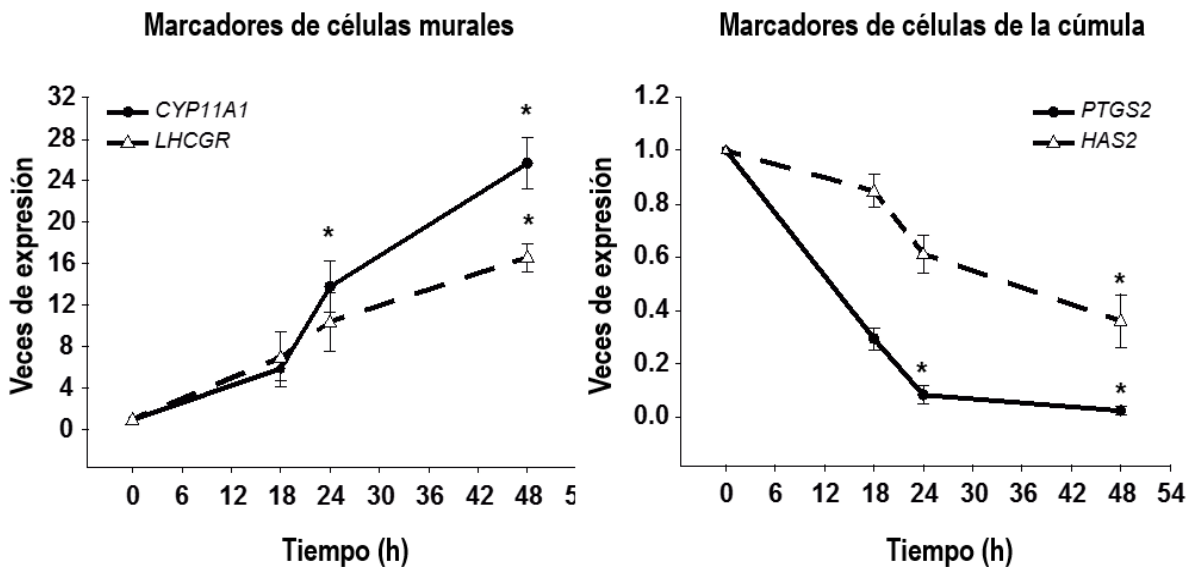


Figura 7. Expresión CYP11A1, LHCGR, PTGS2 y HAS2 en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron mantenidas en cultivo y fueron cosechadas en Trizol a 0, 18, 24 y 48 h. Se extrajo el RNA y éste fue analizado por qRT-PCR para los genes asociados en la literatura con las células de la cúmula (PTGS2 y HAS2), células murales (CYP11A1 y LHCGR). Se usó HPRT como gen de referencia. Los datos se expresan como relación relativa con respecto al tiempo cero (células no cultivadas). Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, $p < 0.05$.

3.2.2 Producción hormonal

Como segunda parte de la caracterización del cultivo se evaluó la producción hormonal. Se decidió evaluar P4 y E2 pues ambas hormonas son producidas por células murales. Para esta evaluación se colectó el medio de cultivo a las 18, 24 y 48 h post-siembra (Figura 8). Para la evaluación de E2 se adicionó testosterona ($1 \mu\text{M}$) como precursor para su síntesis ya que de manera endógena los precursores de E2 son suplidos por las células de la teca interna.

La producción hormonal fue evaluada por inmunodetección y como se muestra en la Figura 6, la producción de P4 aumentó conforme transcurrió el tiempo de cultivo, siendo significativo a partir de las 18 h. Sin embargo, la producción de E2 se mantuvo estable durante todo el cultivo.

Las células murales a diferencia de las células de la cúmula se caracterizan por su actividad esteroidogénica principalmente. Lo observado en la producción hormonal se relaciona con lo observado en la expresión génica de enzimas esteroidogénicas conforme transcurre el tiempo

en cultivo. Debido a que la producción de P4 aumentó con respecto al tiempo de cultivo, esto indicó que el cultivo primario de células murales es un cultivo luteinizado.

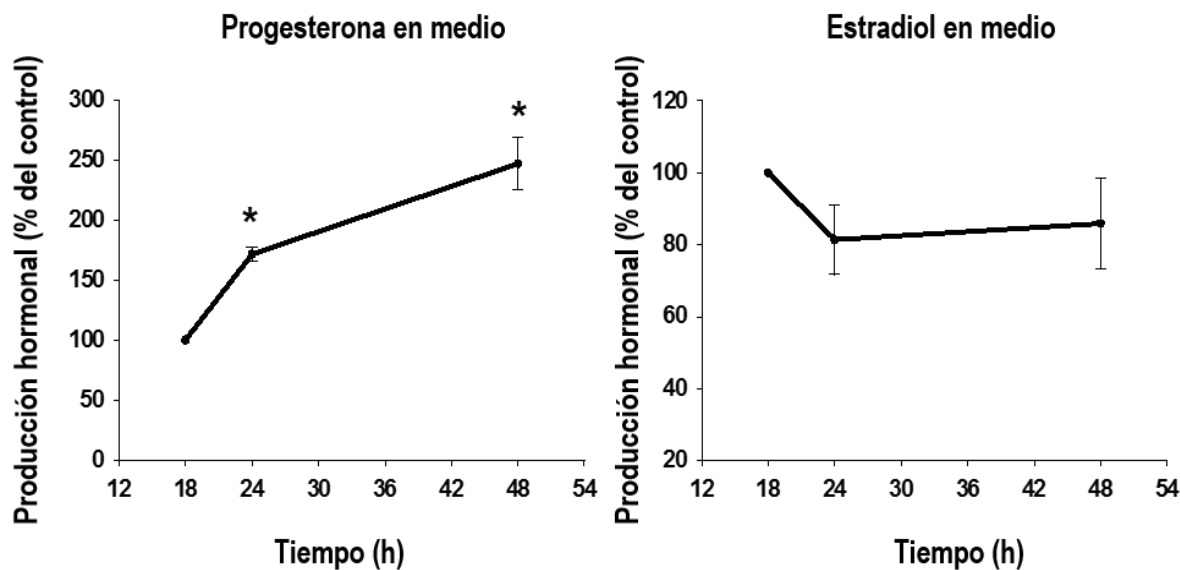


Figura 8. Producción de progesterona y estradiol en células de la granulosa en cultivo. El medio de cultivo fue recolectado a 18, 24 y 48 h de cultivo para su análisis. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, $p < 0.05$.

3.3 Evaluación de la funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo *in vitro* para evaluar el efecto de disruptores endocrinos

Para determinar si este modelo fue útil para evaluar el efecto de los DE con capacidad estrogénica, se evaluó la sensibilidad del cultivo primario de células murales luteinizadas expuestas a DES como un DE con carácter estrogénico prototipo. Para esta evaluación se analizó el efecto de este compuesto sobre la producción hormonal (P4 y E2) y sobre la expresión de enzimas esteroideogénicas que participan tanto en la síntesis de E2 (*CYP19A1* y *17 β -HSD*) como en la de P4 (*CYP11A1* y *3 β -HSD*). Se empleó una concentración de 5 μ M de DES con base en su efecto sobre la producción de P4 y sobre el mRNA del *CYP11A1* (enzima intermediaria de la conversión de pregnenolona a P4) reportada en la literatura (Warita et al, 2010). Como se puede observar en la figura 9, el DES disminuyó de manera significativa la producción de P4, pero no alteró la producción de E2.

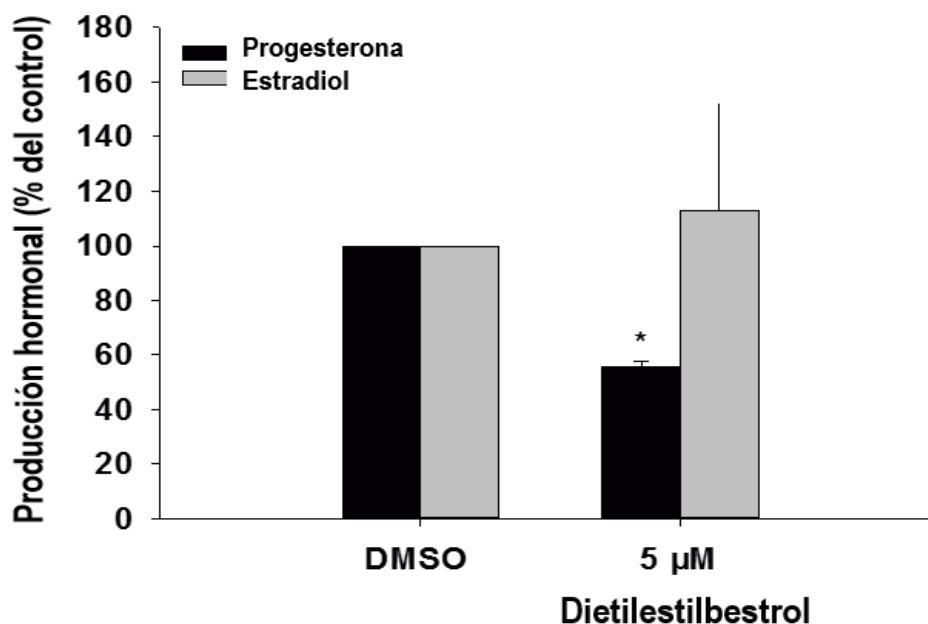


Figura 9. Efecto del DES sobre la producción de progesterona y estradiol en células de la granulosa después de 24 h de exposición. Las células de granulosa fueron expuestas a DES por 24 h y fue recolecto el sobrenadante para determinar los niveles hormonales. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * $p < 0.05$.

Con respecto a la expresión génica de las enzimas esteroidogénicas que participan en la síntesis de P4 después de la adición de DES, la expresión de 3β -HSD disminuyó de manera significativa estadísticamente respecto al control (DMSO); *CYP11A1* también disminuyó en su expresión con respecto al control (DMSO), el cual no fue estadísticamente significativo (Figura 10).

En cuanto a la expresión de las enzimas encargadas en la síntesis de E2, el DES causó una disminución significativa estadísticamente de ambas enzimas (*CYP19A1* y 17β -HSD) como se observa en la Figura 11. Con respecto al efecto de BPA, ambas concentraciones empleadas (4.3 y 43 µM) causaron una disminución en la producción de P4, así como en la expresión de las enzimas esteroidogénicas (figuras 12 y 13), lo cual era de esperarse en base a lo reportado en la literatura (Mansur et al., 2017). Con los resultados anteriores concluimos que el cultivo de células murales luteinizadas es sensible al efecto de los DE con carácter estrogénico y puede servir como un modelo para evaluar el efecto de los parabenos.

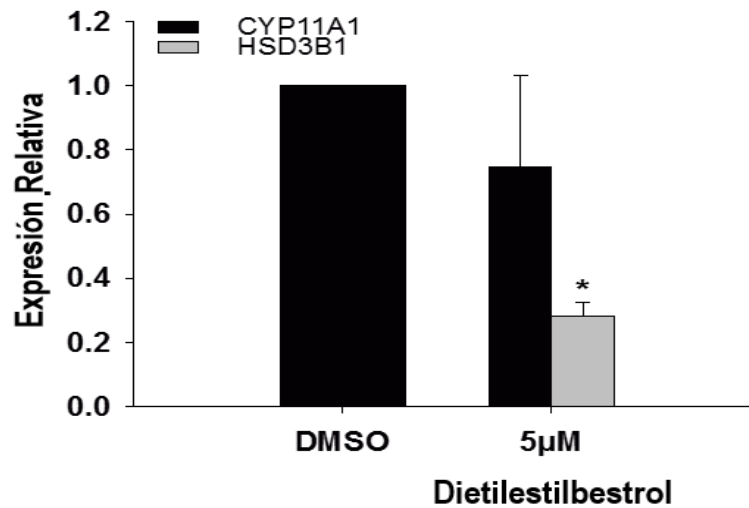


Figura 10. Efecto del DES sobre la expresión de CYP11A1 y HSD3B1 en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron expuestas a DES por 24 h. Se extrajo el RNA y éste fue analizado por qRT-PCR y se usó HPRT como gen de referencia. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * p<0.05.

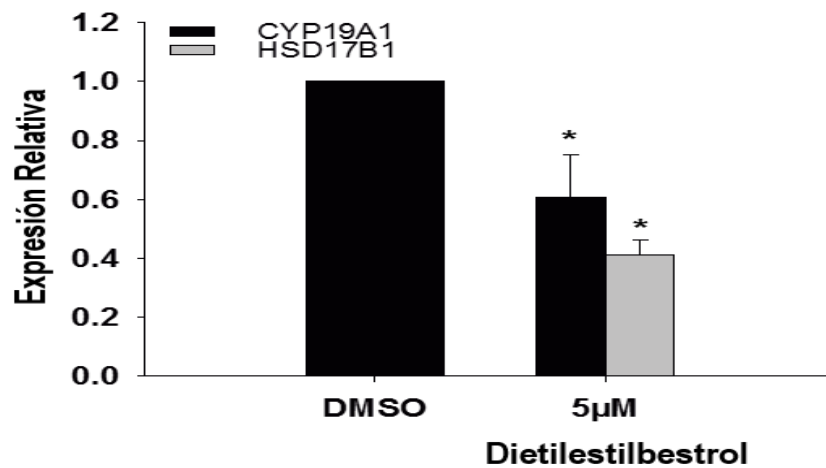


Figura 11. Efecto del DES sobre la expresión de CYP19A1 y HSD17B1 en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron expuestas a DES por 24 h. Se extrajo el RNA y éste fue analizado por qRT-PCR y se usó HPRT como gen de referencia. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * p<0.05.

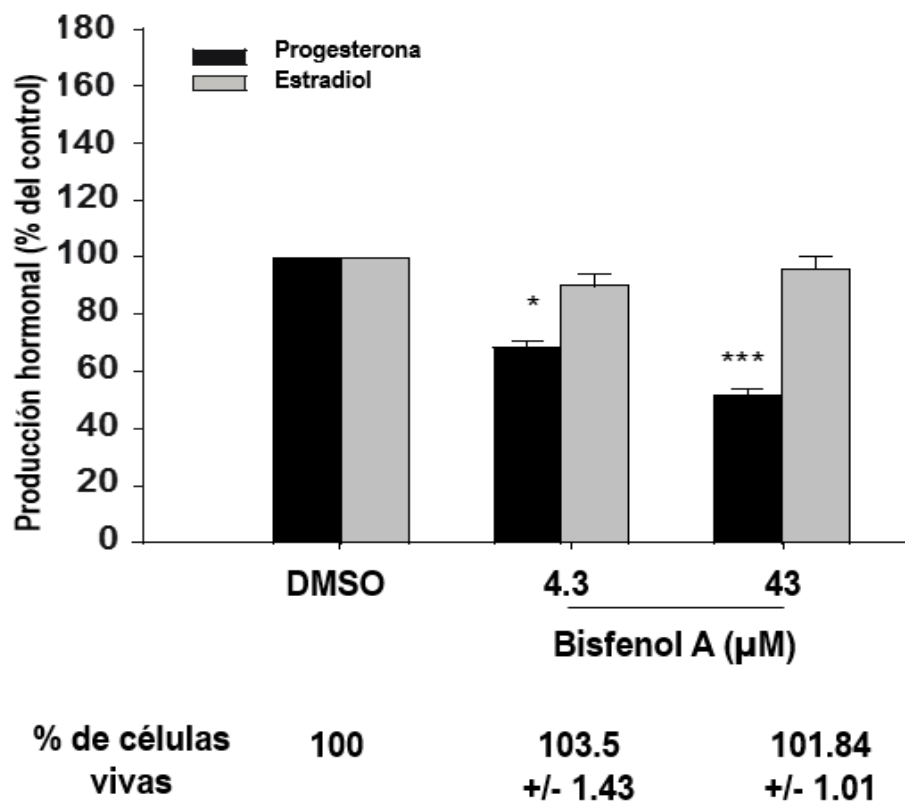


Figura 12. Efecto del BPA sobre la producción de progesterona y estradiol en células de la granulosa en cultivo. Las células de granulosa fueron expuestas a BPA por 24 h y el sobrenadante fue recolectado para determinar los niveles hormonales. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

3.4 Efectos de los parabenos *in vitro*

Se decidió evaluar el efecto de los dos parabenos más usados en la industria: metil-parabeno (baja estrogenicidad) y butil-parabeno (alta estrogenicidad). Además, se evaluó el efecto de BPA como un compuesto comparativo debido a que ya se conoce su efecto como DE.

Los ensayos para la evaluación *in vitro* de los efectos de los compuestos de interés se realizaron de la siguiente manera: el tratamiento con cada uno de los compuestos inició cuando las células ya son murales con presencia de actividad esteroideogénica (24 h de cultivo) y el tratamiento terminó a las 48 h, por lo que el tiempo de exposición fue de 24 h como se muestra en la figura 14.

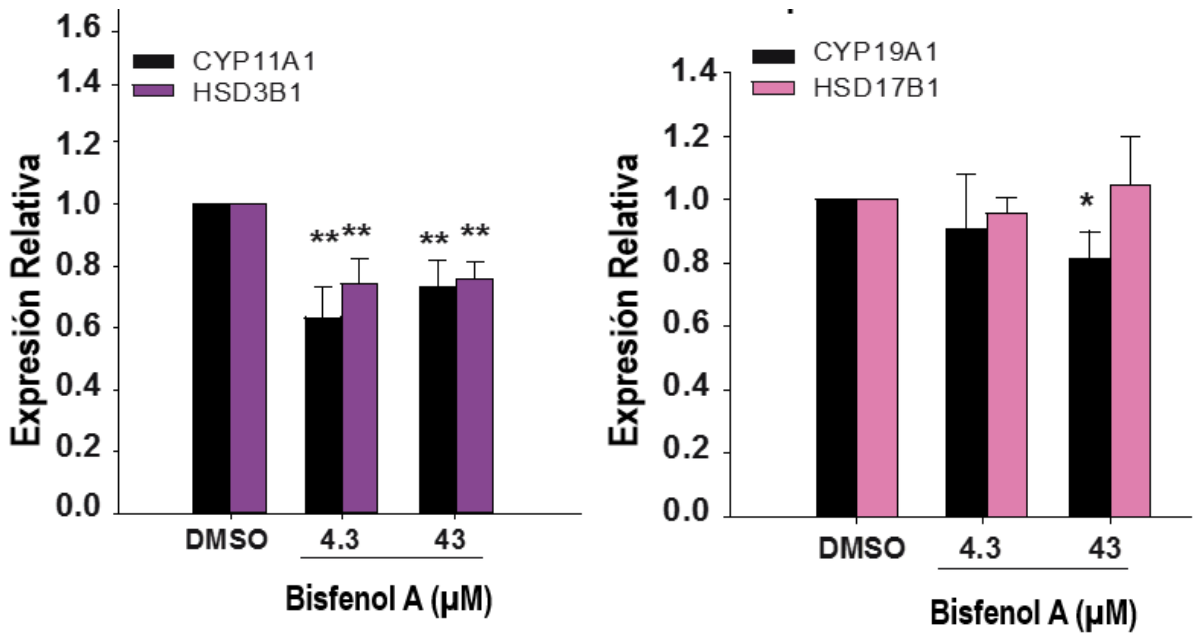


Figura 13. Efecto del BPA sobre la expresión de CYP11A1, HSD3B1, CYP19A1 y HSD17B1 en células de la granulosa en cultivo. Células de la granulosa fueron expuestas a BPA por 24 h. Se extrajo el RNA y éste fue analizado por qRT-PCR y se usó HPRT como gen de referencia. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * $p < 0.05$.

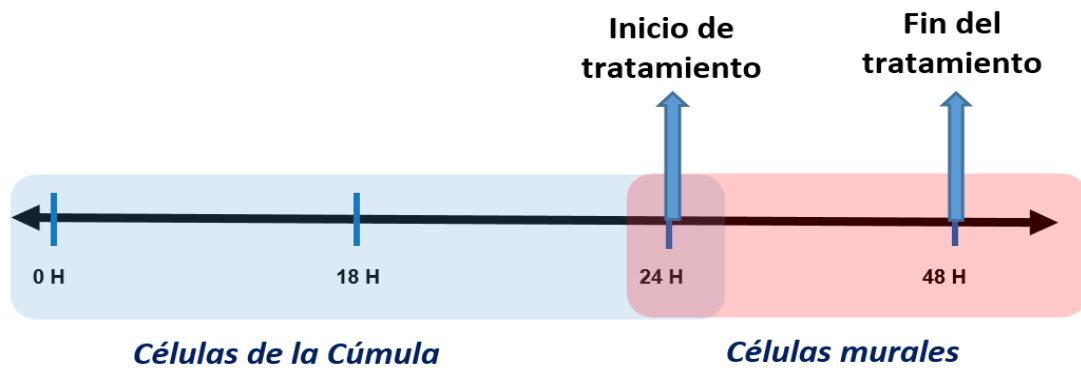


Figura 14. Esquema de tratamiento.

3.4.1 Citotoxicidad

Previo a la evaluación del efecto de los compuestos de interés sobre la expresión de genes que participan en la esteroidogénesis y la producción hormonal, fue necesario determinar si éstos presentan un efecto citotóxico significativo tras la exposición a las diferentes concentraciones seleccionadas.

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos de interés se utilizó el método de MTT. Los resultados mostraron que la viabilidad celular no se afecta significativamente por ningún compuesto a las concentraciones probadas (Figura 15) por un periodo de 24 h. Con lo anterior se concluye que los parabenos y BPA no son citotóxicos en este cultivo primario de células murales. Para las posteriores evaluaciones se utilizaron todas las concentraciones seleccionadas previamente.

3.4.2 Efecto de los parabenos sobre la expresión de enzimas esteroidogénicas

Se evaluó el efecto de los parabenos sobre la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis de E2 y P4 por medio de qRT-PCR. Como se observa en la Figura 16, el metil-parabeno a las concentraciones utilizadas no alteró la expresión génica de las enzimas que participan en la síntesis de P4 y E2 durante 24 h de tratamiento.

Con respecto al butil-parabeno, ningún tratamiento modificó la expresión de las enzimas esteroidogénicas como se observa en la Figura 17. El BPA tampoco causó modificaciones en la expresión de las enzimas esteroidogénicas que participan en la síntesis de E2 y P4 (figura 18).

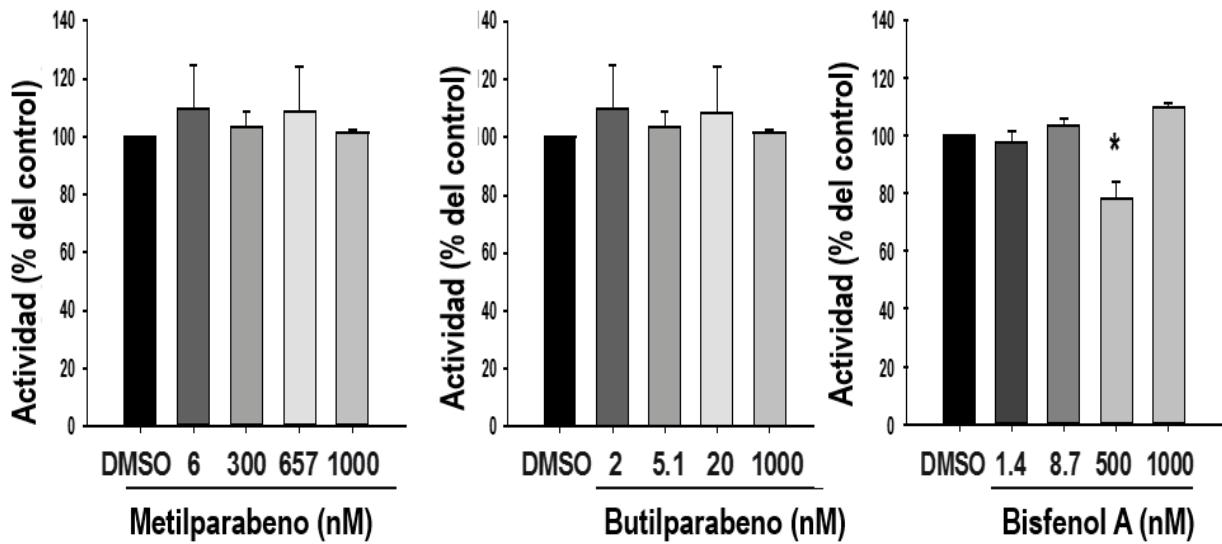


Figura 15. Efecto de metilparabeno, butilparabeno y bisfenol A sobre la viabilidad celular en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron sometidas a 24 h de exposición a cada una de las concentraciones de interés, comparado con el control (DMSO) y la viabilidad fue evaluado por el ensayo de MTT. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * $p < 0.05$.

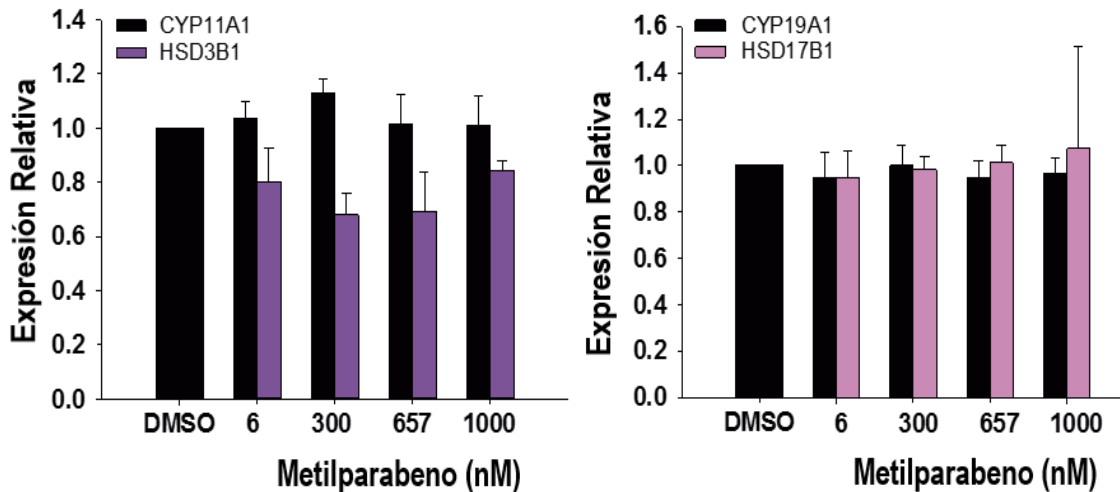


Figura 16. Efecto del metil-parabeno sobre la expresión de CYP11A1, HSD3B1, CYP19A1 y HSD17B1 en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron expuestas a metilparabeno durante 24 h. Se extrajo el RNA y éste fue analizado por qRT-PCR y se usó HPRT como gen de referencia. Los datos

representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * p<0.05.

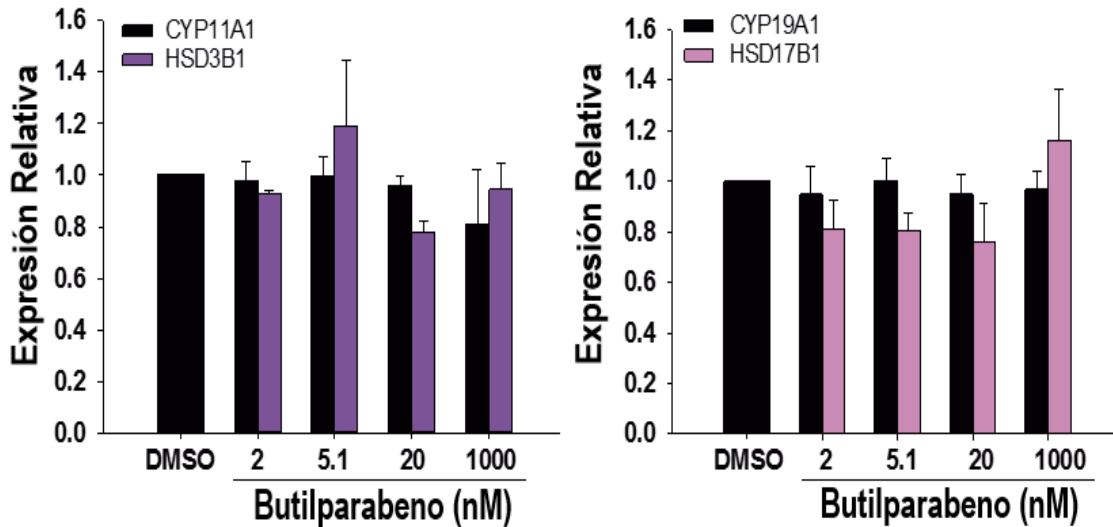


Figura 17. Efecto de butil-parabeno sobre la expresión de CYP11A1, HSD3B1, CYP19A1 y HSD17B1 en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron expuestas a butil-parabeno durante 24 h. Se extrajo el RNA y éste fue analizado por qRT-PCR y se usó HPRT como gen de referencia. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * p<0.05.

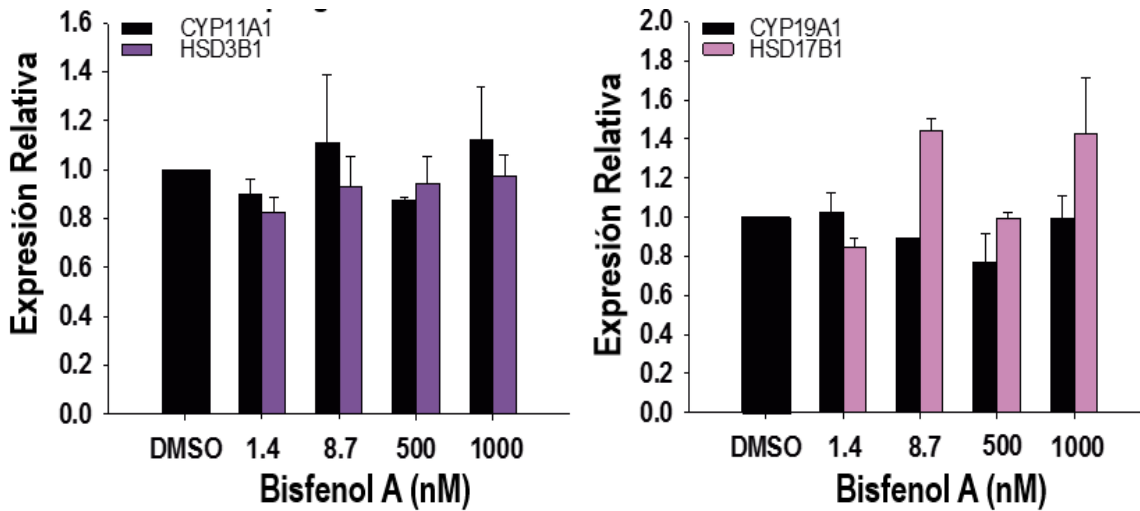


Figura 18. Efecto del BPA sobre la expresión de CYP11A1, HSD3B1, CYP19A1 y HSD17B1 en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron expuestas a BPA durante 24 h. Se extrajo el RNA y éste fue analizado por qRT-PCR y se usó HPRT como gen de referencia. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * p<0.05.

3.4.3 Efecto de los parabenos y BPA sobre la producción de progesterona y estradiol en cultivo

Para determinar el posible efecto de los parabenos o BPA sobre la producción de P4 y E2, se cuantificó la producción hormonal. Ninguno de los parabenos evaluados alteró la producción de E2 o P4 como se observa en la Figura 19. El BPA a ninguna de las concentraciones empleadas alteró la producción hormonal (Figura 20). Se puede concluir que los parabenos no alteran la esteroidogénesis en un cultivo primario de células murales luteinizadas, pues no modifican la expresión génica de enzimas esteroidogénicas y producción hormonal, por lo que no actuarían como disruptores endocrinos a este nivel.

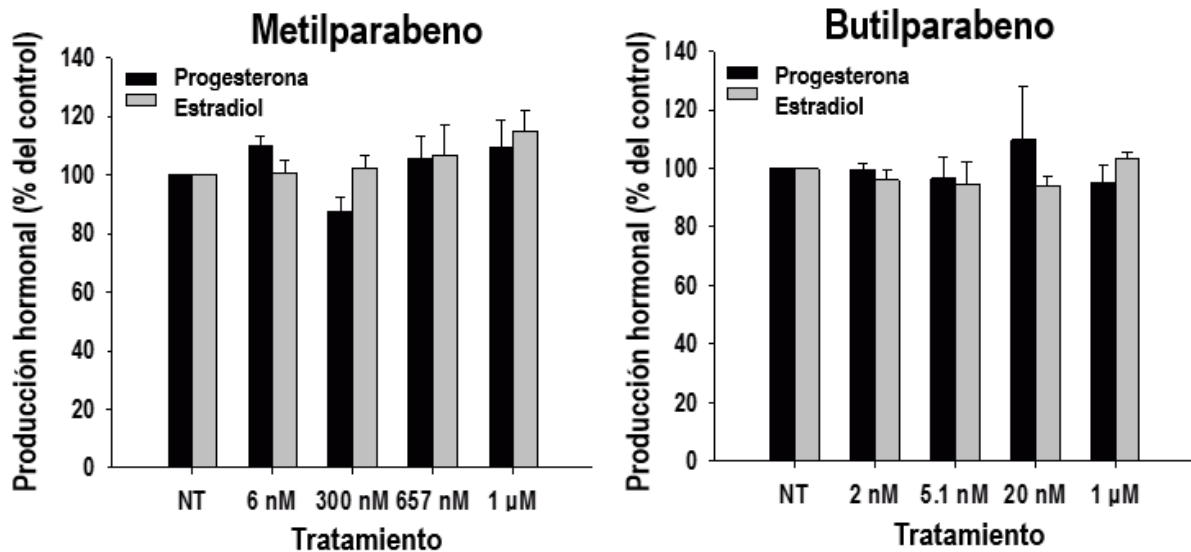


Figura 19. Efecto de metil-parabeno y butil-parabeno sobre la producción de progesterona y E2. Las células de la granulosa fueron expuestas durante 24 h a cada una de las concentraciones de interés y los sobrenadantes fueron recolectados para su análisis. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * p<0.05.

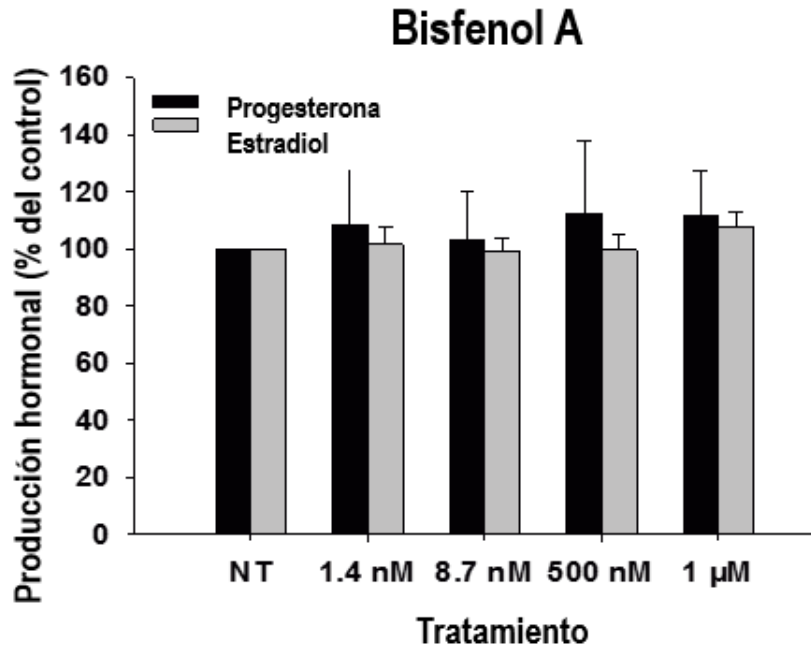


Figura 20. Efecto del BPA sobre la producción de progesterona y E2 en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron expuestas 24 h a cada una de las concentraciones de interés y los sobrenadantes fueron recolectados para su análisis. Los datos representan tres experimentos independientes por triplicado. Cada punto representa la media \pm S. E (n=3). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguida por un post test de Dunnet, * p<0.05.

4. DISCUSIÓN

En la actualidad existe preocupación con respecto a la capacidad estrogénica que han mostrado los parabenos y la cual ha sido descrita por varios autores en modelos *in vivo* e *in vitro*, sin embargo, hay estudios que muestran el nulo efecto de los parabenos como disruptores endocrinos lo que ha provocado controversia sobre el uso continuo de estas sustancias (Soni et al., 2005). Este trabajo se enfocó a analizar el efecto de los parabenos sobre la esteroidogénesis en cultivos primarios de células de la granulosa procedentes de mujeres sometidas a un procedimiento de reproducción asistida demostrando que es un modelo adecuado para el estudio de efectos esteroidogénicos y que eventualmente puede ser empleado para evaluar los efectos sobre la esteroidogénesis de diversos DE.

4.1 Cultivo primario de células de la granulosa humana

Para entender los efectos y mecanismos por los cuales los DE pueden alterar la esteroidogénesis se requiere de células disponibles para la realización de estudios *in vitro*. En este trabajo establecimos un cultivo primario de células murales a partir de células de la cúmula, fáciles de manejar y de bajo costo. El cultivo celular se comporta como células murales luteinizadas que fue determinado por el aumento en la producción de P4.

El modelo de células murales luteinizadas humanas es un cultivo celular primario que tiene características y propiedades que lo hacen apto para llevar a cabo estudios para evaluar los efectos de los DE (Hughes et al., 1990). Una de las principales funciones de estas células es la producción de hormonas, especialmente P4 (hormona primordial en el embarazo).

Estas células, *in vivo*, se ubican dentro del folículo ovárico y se encuentran en contacto con el líquido folicular; lo anterior hace posible evaluar el efecto *in vitro* que tendrían algunos compuestos que ingresan al folículo y se encuentran formando parte del líquido folicular, entrando en contacto con las células murales (Figura 21).

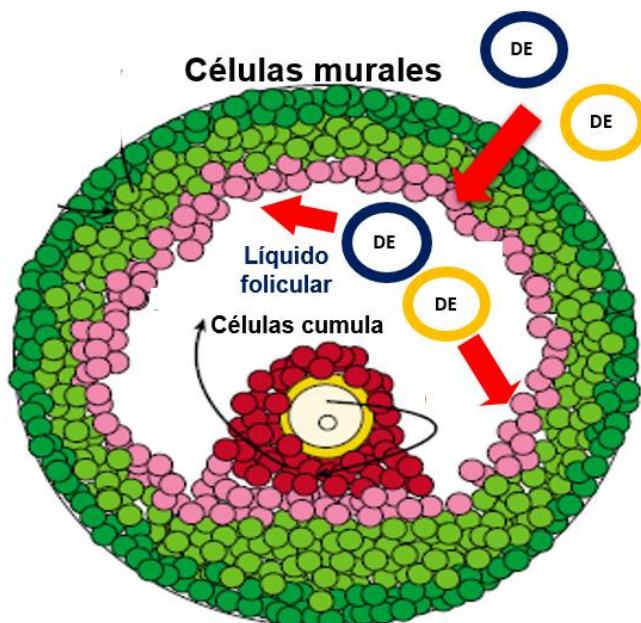


Figura 21. Presencia de DE en líquido folicular. La presencia de DE en líquido folicular puede favorecer la interacción de estos con células de la granulosa presentes en el folículo ovárico y causar efectos sobre sus funciones.

Las células de la granulosa pueden ser obtenidas de mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida, que no implica algún riesgo durante dicho proceso, pues las células son eliminadas del ovocito como parte del protocolo y posteriormente son desechadas sin algún uso. Debido a que las células recolectadas pueden provenir de varias pacientes, se puede llegar a recolectar una cantidad suficiente para la realización de un cultivo primario para analizar diversos efectos de los DE.

Hay varios puntos sobresalientes de este modelo celular. Este es el primer estudio que realiza un cultivo primario de células de la granulosa humana a partir de células de la cúmula para evaluar el efecto de algunos DE. Prácticamente todos los estudios disponibles que evalúan el efecto de algunos DE emplean células murales obtenidas del líquido folicular aspirado. Las células de la granulosa recolectadas del cúmulo tienen una escasa contaminación de sangre proveniente de la punción folicular comparada con las células murales obtenidas a partir de líquido folicular. Lo anterior representó una ventaja pues la presencia de otro tipo celular como las células sanguíneas en el cultivo puede generar cambios en las características de las células de interés (Chilvers, Bodenbun, Denner, & Urban, 2012). Al tener una escasa contaminación de sangre, las células de la cúmula pueden ser lavadas con PBS para eliminar células sanguíneas

no adherentes. Las células murales obtenidas de líquido folicular presentan una alta contaminación de células sanguíneas, granulocitos, leucocitos y células epiteliales que a menudo están presentes en el líquido folicular de las aspiraciones, por lo que es necesario emplear otros procesos de purificación que traen consigo un aumento en el costo y complejidad del método de cultivo (Chilvers et al., 2012).

Se caracterizó parcialmente el cultivo primario de células de la granulosa empleando transcritos característicos de las células de la cúmula y de las murales para identificar con que tipo celular se estaba trabajando. Además, se evaluó la funcionalidad del cultivo para producir hormonas y determinar si este modelo sería el adecuado para evaluar los efectos de algunos DE. Los estudios existentes (tabla 6) que utilizan un cultivo primario de células de la granulosa humana para evaluar el efecto de algunos DE no realizan una caracterización previa, lo cual puede representar una desventaja ya que las células en cultivo pueden perder algunas características propias, perdiendo así su funcionalidad.

Tabla 6. Evaluación de DE en cultivo primario de células de la granulosa

Compuesto	Modelo celular	Fuente de obtención	Tiempo de cultivo	Caracterización del cultivo	Referencias
Mono (2-etilhexil) ftalato	Células de la granulosa luteinizadas	Líquido folicular	67 h	Producción de P4 y E2	(Reinsberg, Wegener-Toper, van der Ven, van der Ven, & Klingmueller, 2009)
Dibutilftalato	Células de la granulosa luteinizadas	Líquido folicular	96 h	S/D	(Adir et al., 2017)
Butilparabeno	Células de la granulosa luteinizadas	Líquido folicular	120 h	S/D	(Guerra et al., 2016)
Bisfenol A	Células de la granulosa luteinizadas	Líquido folicular	96 h	S/D	(Mansur et al., 2017)
Metilparabeno y Butilparabeno	Células de la granulosa luteinizadas	Células obtenidas de la de-comulación del ovocito	48 h	Producción de P4, E2 y expresión de mRNA CYP11A1 y LHCGR	Este trabajo

S/D-Sin datos

Como se puede observar en la tabla anterior, la mayoría de los estudios que emplean este tipo de células no realizan una caracterización en cuanto a funcionalidad y/o expresión génica que asegure que en el tiempo de cultivo se conserven las características propias de estas células.

En este trabajo, se mantuvieron las células en cultivo por un periodo de 48 H, observando que durante este tiempo las células eran funcionales. Hay estudios que utilizan un tiempo más prolongado de cultivo de hasta por 96 h lo que puede implicar una pérdida de la funcionalidad del cultivo primario.

En los resultados se observó que el cultivo presenta un proceso de diferenciación aparente en donde las células de la cúmula se diferencian a células murales luteinizadas durante el periodo de cultivo. Lo anterior representa una ventaja para futuros estudios puesto que la función de cada subpoblación de granulosa (cúmula/mural luteinizada) puede ser evaluada con el establecimiento de condiciones óptimas para mantener una subpoblación en específico. Además, con el desarrollo de marcadores génicos y hormonales del cultivo primario en este trabajo, pueden ser utilizados como blanco de algunos DE sobre el proceso de diferenciación aparente en estas células.

Empleamos un cultivo primario de células de la granulosa para evaluar el efecto de algunos DE sobre la esteroidogénesis, Actualmente ya existen diversas líneas celulares de la granulosa bien caracterizadas en cuanto a sus funciones. Sin embargo, a pesar de que las líneas celulares son técnicamente más fáciles de trabajar comparadas con el cultivo primario, las líneas celulares pueden adquirir diferentes patrones de expresión génica, perdiendo características de los estados celulares fisiológicos, particularmente cuando son manipulados por una serie de métodos como transfección con oncogenes o genes supresores de tumores (Havelock et al., 2004).

Una de las limitaciones de este modelo es el origen de las células. Aunque provienen de mujeres sanas y fértiles (donadoras y mujeres que reciben tratamiento por infertilidad masculina), estas mujeres han estado expuestas a parabenos durante la mayor parte de su vida e incluso a DES más potentes, por lo que consideramos que esta característica puede ser crítica.

4.2 Caracterización del cultivo primario de células de la granulosa

Se evaluó la expresión de genes característicos de células de la cúmula (*PTGS2* y *HAS2*) y células murales (*LCGR* y *CYP11A1*) así como la producción hormonal de E2 y P4. Observamos que las células de la granulosa a las 24 h de cultivo no expresan los genes de células de la cúmula y expresan genes de células murales, además, la producción de P4 aumenta con respecto al tiempo de cultivo y la producción de E2 se mantiene estable. Estudios previos han mostrado que el ovocito es fundamental para mantener el fenotipo de ambas subpoblaciones de células de la granulosa al secretar factores de crecimiento como GDF9 y BMP15 que inciden de manera directa sobre las células que rodean al ovocito manteniendo así las características de esta población, sin embargo, al estar más lejos las células que se encuentran en la pared del folículo del ovocito, los factores inciden en menor cantidad manteniendo así sus características de células murales, y por lo tanto, aumentado la producción de hormonas esteroideas características de esta población de células (Diaz et al., 2006; Diaz et al., 2007).

El medio de cultivo empleado en este trabajo fue suplementado con SFB (1%). El SFB proporciona un amplio espectro de macromoléculas, proteínas transportadoras de sustancias lipoides y oligoelementos, nutrientes de bajo peso molecular, hormonas y factores de crecimiento (Valk et al., 2018). Estos dos últimos componentes del SFB pueden ser causantes de la diferenciación de las células de la cúmula a células luteinizadas, aunado a la pérdida de la influencia de los factores secretados por el ovocito durante el proceso de decumulación (Figura 22) causando la activación de transcritos como *CYP11A1* enzima que se encarga de realizar la escisión de la cadena lateral del colesterol y generar la pregnenolona, paso limitante para la producción de P4 (Havelock, Rainey, & Carr, 2004).

Se ha observado que la expresión de la aromatasa, enzima clave en la biosíntesis de E2, disminuye en el progreso de la luteinización después de una inducción con LH o Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (Stocco, Telleria, & Gibori, 2007). Interesantemente en este trabajo, observamos que la producción de E2 se mantuvo constante durante todo el tiempo en cultivo. Lo anterior es un hallazgo que debe ser estudiado en futuros trabajos.

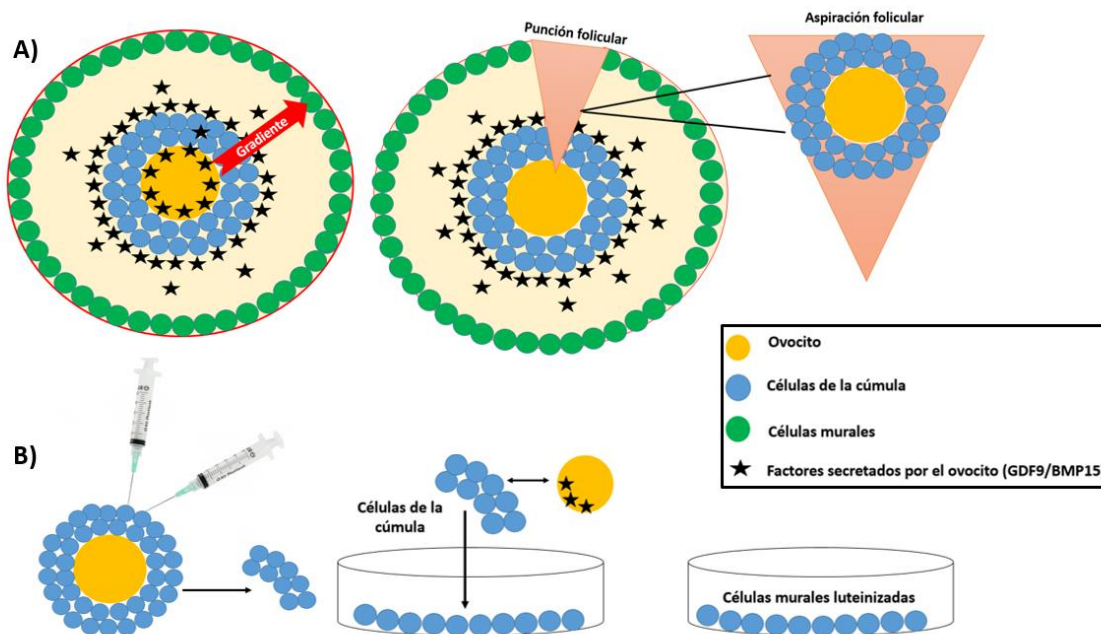


Figura 22. Diferenciación de las células de la cúmulo a células murales. A) Los factores secretados por el ovocito (GDF9/BMP15) inciden sobre las células de la cúmulo manteniendo así su fenotipo y suprimen el fenotipo mural, sin embargo, las células ubicadas en la periferia, al estar más alejadas del ovocito y a los factores secretados por éste, se diferencian a mural. B) Separación mecánica de las células de la cúmulo del ovocito interrumpe la señalización ejercida por los factores de crecimiento (GDF9/BMP15), causando la luteinización.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que las células de la cúmulo cultivadas se diferencian conforme transcurre el tiempo de cultivo a células murales luteinizadas, lo que lo hace un modelo adecuado para analizar la producción hormonal de P4 principal hormona producida en células luteinizadas y la expresión de enzimas que participan en ella. Es necesario considerar en futuros estudios modelos de cultivos de células de la granulosa que permitan evaluar la producción hormonal en la etapa ovulatoria y folicular.

4.3 Funcionalidad del cultivo primario de células de la granulosa humana como un modelo in vitro para analizar el efecto de disruptores endocrinos con carácter estrogénico

Se evaluó la capacidad del cultivo para responder ante un DE. Como control positivo, se decidió utilizar DES, un estrógeno sintético no esteroideo que presenta actividad estrogénica alta al unirse al RE y se usa como compuesto prototipo para comparar la potencial capacidad

estrogénica de otros compuestos (Warita et al., 2010). Se ha demostrado la inhibición de la síntesis de P4 en el ovario inmaduro de rata tratada con DES (Imamuchi, 2017) por medio de la disminución del mRNA de CYP11A1, mientras que la transcripción de HSD3B permanece constante. En ovarios de ratas inmaduras expuestas a 2 mg de DES cada 24 h se inhibió el potencial proliferativo de folículos de diferentes tamaños. También se ha observado que el DES altera la actividad de la aromataasa en los folículos y disminuye la producción de P4 y E2 en los mismos (Chakravorty, 1991).

El DES pueden desencadenar diferentes efectos dependiendo de ER que active (Pennie, 1998); mientras que ER β es el receptor principal en todo el ovario y las células testiculares de Leydig (se ha observado una regulación negativa de la expresión de CYP11A1) (Imamichi, 2017; Warita, 2010), las células de la granulosa expresan principalmente el ER α (Cui, 2013).

En este estudio se observó que el tratamiento con DES disminuyó la producción de P4 y la expresión de la enzima *HSD3B1* (enzima limitante para la síntesis de P4) de manera significativa. Otro estudio mostró que el E2 es capaz de disminuir la producción de P4 en células de la granulosa y teca en cultivo (Fortune & Hansel, 1979), lo anterior justifica el efecto observado del DES, compuesto estrogénico, sobre la producción de P4 (Fortune & Hansel, 1979).

Adicionalmente, se evaluó el efecto que tuvo el DES sobre la producción de E2 y la expresión de enzimas que participan en su síntesis (*CYP19A1* y *HSD17B1*), cuya expresión disminuyó de manera estadísticamente significativa. Sin embargo, la producción de E2 no se vio afectada. Estudios realizados con Mono (2-etilhexil) ftalato sobre la producción esteroidea en células de la granulosa humana muestran que la actividad de las enzimas no se vio afectada pero sí la expresión de dichas enzimas (Reinsberg et al., 2009), sugiriendo que los efectos de DES sobre la expresión de las enzimas que participan en la síntesis de E2 no se reflejan a nivel de su proteína, por lo que no se afecta la producción de E2. Aunque uno pensaría que la cantidad de una proteína disminuye cuando se reduce la transcripción de su gen codificador, existen otros mecanismos que regulan la abundancia de la proteína. Por ejemplo, la vida media de la proteína podría aumentar debido a una tasa reducida de degradación. La estabilidad de la proteína puede incrementarse debido a modificaciones postraduccionales como la fosforilación, acetilación,

glicosilación, etc. La proteína puede ser una proteína de larga vida que se acumula con el tiempo mientras que la renovación del ARNm es rápida (Coller et al., 2018).

Otro compuesto utilizado para evaluar la funcionalidad del cultivo fue el BPA, monómero que fue desarrollado inicialmente como un estrógeno sintético y subsecuentemente éste fue utilizado como un polímero formando parte de muchos plásticos. Nuestro cultivo respondió a la exposición con BPA, causando la alterando de la producción hormonal y la expresión de enzimas esteroidogénicas tras el tratamiento (Abdallah Mansur, 2016).

Se concluye que el cultivo desarrollado es sensible a un compuesto estrogénico a través de la alteración en la producción de P4. Además, este cultivo primario de células murales luteinizadas es un buen modelo para evaluar el efecto de compuestos con actividad estrogénica a partir de la evaluación de la producción de P4 que puede constituir un blanco para un DE.

4.4 Efecto de los parabenos y BPA sobre la esteroidogénesis en células de la granulosa humana

Evaluamos el efecto de dos parabenos sobre la esteroidogénesis (metil-parabeno y butil-parabeno), los cuales son los más usados en la industria y representan un parabeno con baja y alta capacidad estrogénica, respectivamente. Además, se evaluó el efecto del BPA como un compuesto comparativo, puesto que este compuesto es reconocido por su efecto en la esteroidogénesis *in vivo* e *in vitro*. Empleamos concentraciones que han sido cuantificadas en mujeres expuestas en diferentes fluidos biológicos (suero, sangre de menstruación y líquido folicular (este último únicamente para BPA)).

En este estudio observamos que una exposición aguda de 24 h a metil-parabeno o butil-parabeno no alteró la producción hormonal ni la expresión de los genes que codifican para enzimas esteroidogénicas. Nuestros resultados concuerdan con un estudio previo en el cual emplearon células de la granulosa humana obtenidas de pacientes sometidas a técnicas de Fertilización *in vitro* (FIV), en donde se evaluó el efecto de butil-parabeno sobre la biosíntesis de P4 a diferentes tiempos de exposición (24, 48, 72 y 96 h) empleando concentraciones de 10-10,000 nM observado que a las concentraciones y tiempos ensayados no se observaron disminuciones

significativas en la biosíntesis de P4 (Guerra et al., 2016). En nuestro estudio se emplearon concentraciones menores (2-1,000 nM) y un tiempo de exposición de 24 h sin observar efecto.

Así mismo, los ensayos a las concentraciones empleadas de BPA tampoco provocaron efecto alguno en la esteroidogénesis. En un estudio previo en un modelo de células murales luteinizadas obtenidas del líquido folicular de pacientes sometidas a procedimientos de FIV se observó que el BPA disminuyó de manera significativa la biosíntesis de E2 y P4 el cual fue confirmado por una reducción significativa del mRNA de tres genes que codifican a las enzimas esteroidogénicas *CYP11A1*, *3 β -HSD* y *CYP19A1* (Abdallah Mansur, 2016).

Aunque el efecto anterior fue observado a concentraciones por encima de las detectadas en fluidos biológicos en humanos (1000 y 10,000 ng/ml) en un tratamiento de 48 h (Abdallah Mansur, 2016), sin embargo, dichos efectos probablemente no ocurran en las mujeres expuestas pues las concentraciones cuantificadas en fluidos biológicos son mucho menores. En nuestro estudio utilizamos concentraciones de 0.3 a 230 ng/ml las cuales son notablemente menores a las empleadas en el estudio de Abdallah Mansur et al., 2016 y una exposición de 24 h, parámetros de exposición mucho más acordes a la realidad pues empleamos concentraciones detectadas en diversos fluidos biológicos como suero sanguíneo y sangre de menstruación. Sin embargo, hay que reconocer que bajo condiciones extremas el BPA podría alterar estos genes.

Experimentos en animales han demostrado que los parabenos tienen actividad estrogénica débil; el efecto del butilparabeno mostró ser 100,000 veces más débil que el E2 y un efecto similar al E2 se observó una dosis aproximadamente 25,000 veces más alta que el nivel típicamente utilizado para preservar productos (Nowak 2018).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio no muestran efecto de los parabenos sobre la esteroidogénesis a pesar de que en modelos *in vivo* se hayan observado. Aunque se supone que las vías que conducen a la producción de hormonas ováricas en roedores y humanos son similares, no podemos excluir que estos resultados discrepantes se deban a diferencias entre especies. Además, el efecto de un xenobiótico con actividad hormonal puede verse influenciado por la absorción, distribución y eliminación de un sistema biológico completo (*in vivo*), lo que resulta difícil extrapolar con resultados *in vitro*. Por otro lado, hay que tener en cuenta que las concentraciones empleadas en los trabajos pioneros en donde se observaron efectos

significativos de estos compuestos fueron realizados a dosis que superan las encontradas en fluidos biológicos (Soni et al., 2005).

Se ha observado que los parabenos inhiben la actividad de las sulfotransferasas (SULTs). Las SULTs catalizan la reacción de sulfonación de estrógeno para su metabolismo. Así, los parabenos indirectamente elevan los niveles de estrógenos, que resulta en una elevación de los efectos estrogénicos. Por lo anterior, es necesario realizar más estudios *in vivo* para poder determinar otras vías de acción de los parabenos en un sistema completo.

Otros estudios han mostrado que los parabenos influyen en varios tipos de células cancerosas tales como la MCF-10 y la MCF-7 incrementando su crecimiento y proliferación que puede estar relacionado por una excesiva activación del RE que lleva al incremento de la expresión de genes responsables para la síntesis de factores de crecimiento tales como Factor de Crecimiento tipo Insulínico (IGF1) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), estas sustancias estimulan el crecimiento de células cancerígenas (Khanna and Darbre 2013). Es probable que el efecto sea más notable en células con una alta expresión de RE como las que se mencionan, a diferencia de las células de la granulosa.

En otros estudios también han mostrado que metil, butil y propil parabeno (10 μ M) forman un complejo con el receptor nuclear y causa una disminución del 40% en la actividad transcripcional inducida por testosterona, uno de los factores involucrados en la espermatogénesis. Otros estudios han mostrado que el propilparabeno disminuye los niveles de testosterona en suero de ratas macho disminuyendo así la cantidad y calidad de los espermatozoides. Lo anterior muestra la necesidad de realizar más estudios, no solo sobre los efectos en el sistema reproductor femenino sino también en el sistema reproductor masculino (Oishi 2001).

En este estudio usamos células de la granulosa de mujeres que de una u otra forma han estado expuestas a parabenos y BPA lo cual pudo generar efectos en las células de la granulosa y que puede variar de una mujer a otra, por lo que se realizaron mezclas de células de la granulosa de varias pacientes y donantes en cada cultivo realizado para eliminar la variabilidad entre las muestras de diferentes. Sin embargo, es conveniente realizar estudios futuros para determinar los niveles de parabenos en muestras de líquido folicular.

Una limitante de nuestro estudio fue que realizamos una exposición aguda (24 h) a parabenos y BPA en nuestro cultivo de células murales luteinizadas, que puede diferir de la exposición *in vivo* en humanos puesto que los parabenos son compuestos que están presentes prácticamente en todos los productos de belleza, cuidado personal y alimentos que son usados diariamente por largos periodos de tiempos. Lo anterior nos lleva a sugerir la necesidad de evaluar el efecto de estos compuestos sobre la esteroidogénesis tras una exposición crónica, ya que en humanos el efecto puede deberse a una exposición crónica, inclusive a bajas concentraciones.

Otro aspecto importante es que en el presente estudio sólo realizamos exposiciones individuales a cada parabeno o BPA. Sin embargo, la exposición humana a DE es usualmente una exposición a una mezcla, por lo que es necesario realizar estudios con exposiciones, de los principales DE a los que los seres humanos estamos expuestos, en “coctel”. Lo anterior pudiera dar algún efecto que no es observado cuando sólo se realizan exposiciones individuales. Finalmente podemos concluir que metil-parabeno, butil-parabeno y BPA, no ejercen un efecto sobre la esteroidogénesis a dosis detectadas en fluidos biológicos, en un periodo de exposición de 24 h en un cultivo primario de células murales luteinizadas.

Hasta el momento podemos decir que a concentraciones encontradas en fluidos biológicos y empleando nuestro esquema de tratamiento en el sistema *in vitro* reportado aquí: MPB, BPB y BPA no afectan la producción de E2 o P4 ni la expresión de estas enzimas que participan en este proceso.

Es necesario realizar más estudios para determinar si son otras vías de señalización las que se pueden ver alteradas por los parabenos y que causen una alteración endocrina, ya que la exposición a estos compuestos es prácticamente inevitable puesto que se usan como conservantes en muchos productos de belleza e higiene. En México, alrededor de 100 millones de habitantes (79.2% de la población total) han usado, al menos, un producto que los contiene y lo hacen durante toda su vida (Canipe, 2017), alcanzando las mujeres el mayor consumo de estos productos en la edad reproductiva, que es cuando podrían ser más susceptibles a los efectos estrogénicos (Chan et al., 2015).

5. CONCLUSIONES

1. Establecimos las condiciones de transporte y de cultivo de células de la granulosa humana que corresponde a un cultivo primario de células de la granulosa luteinizadas.
2. Este cultivo primario de células de la granulosa murales luteinizadas permite detectar y analizar los efectos de disruptores endócrinos de carácter esteroideogénico como el DES, midiendo la alteración a nivel de la expresión génica de enzimas que participan en la síntesis de P4 y la alteración en la producción hormonal.
3. Los parabenos no parecen alterar la esteroideogénesis en el cultivo de células de la granulosa murales luteinizadas a las concentraciones encontradas en diferentes fluidos de mujeres expuestas.

6. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo estudios adicionales para determinar que otras vías de señalización pudieran alterarse por los parabenos causando una alteración endocrina, ya que la exposición a estos compuestos es prácticamente inevitable.
- Determinar el efecto de los tratamientos en “coctel” de estos compuestos pues normalmente la exposición a PB es en mezcla (otros PB y otros compuestos).
- Determinar los niveles de diferentes parabenos en muestras de líquido folicular en una población expuesta y estudiar la asociación entre su presencia y las alteraciones en la fertilidad, especialmente aquellas relacionadas con la falla ovárica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah Mansur, M. A., Gil Yerushalmi, Ariel Hourvitz, Hila Gitman, Yuval Yung, Raoul Orvieto, and Ronit Machtinger. (2016). Does BPA alter steroid hormone synthesis in human granulosa cells in vitro? *Human Reproduction*, 31, 1562-1569.
- Adir, M., Combelles, C. M. H., Mansur, A., Ophir, L., Hourvitz, A., Orvieto, R., . . . Machtinger, R. (2017). Dibutyl phthalate impairs steroidogenesis and a subset of LH-dependent genes in cultured human mural granulosa cell in vitro. *Reprod Toxicol*, 69, 13-18. doi:10.1016/j.reprotox.2016.12.007
- Ahn, H. J., An, B. S., Jung, E. M., Yang, H., Choi, K. C., & Jeung, E. B. (2012). Parabens inhibit the early phase of folliculogenesis and steroidogenesis in the ovaries of neonatal rats. *Mol Reprod Dev*, 79(9), 626-636. doi:10.1002/mrd.22070
- Baerwald, A. R., Adams, G. P., & Pierson, R. A. (2003). Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod*, 69(3), 1023-1031. doi:10.1095/biolreprod.103.017772
- Banerjee, S., Chambliss, K. L., Mineo, C., & Shaul, P. W. (2014). Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids*, 81, 64-69. doi:10.1016/j.steroids.2013.11.002
- Blanchard, C. L., Hidy, G. M., Tanenbaum, S., Edgerton, E. S., & Hartsell, B. E. (2013). The Southeastern Aerosol Research and Characterization (SEARCH) study: temporal trends in gas and PM concentrations and composition, 1999-2010. *J Air Waste Manag Assoc*, 63(3), 247-259.
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., & Hass, U. (2010). Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol*, 30(2), 301-312.
- Chilvers, R. A., Bodenbun, Y. H., Denner, L. A., & Urban, R. J. (2012). Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *J Assist Reprod Genet*, 29(6), 547-556. doi:10.1007/s10815-012-9739-5
- Craig, Z. R., Wang, W., & Flaws, J. A. (2011). Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction*, 142(5), 633-646. doi:10.1530/REP-11-0136
- Chakravorty, A., Mahesh, V. B., & Mills, T. M. (1991). Inhibition by diethylstilboestrol of proliferative potential of follicles of different sizes in immature rat ovaries. *Reproduction*, 92(2), 323-332.
- Darbre, P. D. (2006). Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(1), 121-143. doi:DOI 10.1016/j.beem.2005.09.007
- Darbre, P. D., & Havey, P. W. (2014). Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *Applied Toxicology*, 34, 15.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., . . . Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342. doi:10.1210/er.2009-0002
- Diaz, F. J., O'Brien, M. J., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (2006). The preantral granulosa cell to cumulus cell transition in the mouse ovary: development of competence to undergo expansion. *Dev Biol*, 299(1), 91-104. doi:10.1016/j.ydbio.2006.07.012
- Diaz, F. J., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci*, 120(Pt 8), 1330-1340. doi:10.1242/jcs.000968
- Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, N. M., & Matzuk, M. M. (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*, 13(6), 1035-1048.
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829-838.

- Fan, V. S., Savage, R. E., & Buckley, T. J. (2007). Methods and measurements for estimating human dermal uptake of volatile organic compounds and for deriving dermal permeability coefficients. *Toxicol Mech Methods*, 17(5), 295-304. doi:10.1080/15376510601017801
- Fortune, J. E., & Hansel, W. (1979). The effects of 17 beta-estradiol on progesterone secretion by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology*, 104(6), 1834-1838. doi:10.1210/endo-104-6-1834
- Gilchrist, R. B., Lane, M., & Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, 14(2), 159-177. doi:10.1093/humupd/dmm040
- Guerra, M. T., Furlong, H. C., Kempinas, W. G., & Foster, W. G. (2016). Effects of in vitro exposure to butylparaben and di-(2 ethylhexyl) phthalate, alone or in combination, on ovarian function. *J Appl Toxicol*, 36(9), 1235-1245. doi:10.1002/jat.3335
- Harvey, P. W., & Everett, D. J. (2004). Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *J Appl Toxicol*, 24(1), 1-4. doi:10.1002/jat.957
- Havelock, J. C., Rainey, W. E., & Carr, B. R. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, 228(1-2), 67-78. doi:10.1016/j.mce.2004.04.018
- Imamichi, Y., Sekiguchi, T., Kitano, T., Kajitani, T., Okada, R., Inaoka, Y., ... & Mano, A. (2017). Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Jones, P. S., Thigpen, D., Morrison, J. L., & Richardson, A. P. (1956). p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. III. The physiological disposition of p-hydroxybenzoic acid and its esters. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*, 45(4), 268-273.
- Jun, H. W., Mayer, R. T., Himel, C. M., & Luzzi, L. A. (1971). Binding study of p-hydroxybenzoic acid esters to bovine serum albumin by fluorescent probe technique. *J Pharm Sci*, 60(12), 1821-1825.
- Labat, L., Kummer, E., Dallet, P., & Dubost, J. P. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product. *J Pharm Biomed Anal*, 23(4), 763-769.
- Khanna, S., & Darbre, P. D. (2013). Parabens enable suspension growth of MCF-10A immortalized, non-transformed human breast epithelial cells. *Journal of Applied Toxicology*, 33(5), 378-382.
- Liao, C., & Kannan, K. (2014). Concentrations and composition profiles of parabens in currency bills and paper products including sanitary wipes. *Sci Total Environ*, 475, 8-15. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.097
- Lindeberg, M., Carlstrom, K., Ritvos, O., & Hovatta, O. (2007). Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum Reprod*, 22(2), 401-406. doi:10.1093/humrep/del408
- Lonning, P. E. (2004a). Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 11(2), 179-189.
- Lonning, P. E. (2004b). Oestrogen suppression--lessons from clinical studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 18(1), 33-45.
- Maheshwari, A., & Fowler, P. A. (2008). Primordial follicular assembly in humans--revisited. *Zygote*, 16(4), 285-296. doi:10.1017/S0967199408004802
- Mansur, A., Israel, A., Combelles, C. M., Adir, M., Racowsky, C., Hauser, R., ... Machtinger, R. (2017). Bisphenol-A exposure and gene expression in human luteinized membrana granulosa cells in vitro. *Hum Reprod*, 32(2), 409-417. doi:10.1093/humrep/dew316
- Marques-Pinto, A., & Carvalho, D. (2013). Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocr Connect*, 2(3), R15-29. doi:10.1530/EC-13-0036
- Nowak, K., Ratajczak-Wrona, W., Górska, M., & Jabłońska, E. (2018). Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and cellular endocrinology*, 474, 238-251.
- Oishi, S. (2001). Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 17(1), 31-39.

- Oktem, O., & Oktay, K. (2008). The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann NY Acad Sci*, 1127, 1-9. doi:10.1196/annals.1434.009
- Pugazhendhi, D., Pope, G. S., & Darbre, P. D. (2005). Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *J Appl Toxicol*, 25(4), 301-309. doi:10.1002/jat.1066
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., & Levin, E. R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, 13(2), 307-319. doi:10.1210/mend.13.2.0239
- Reinsberg, J., Wegener-Topper, P., van der Ven, K., van der Ven, H., & Klingmueller, D. (2009). Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 239(1), 116-123. doi:10.1016/j.taap.2009.05.022
- Richards, J. S., Russell, D. L., Robker, R. L., Dajee, M., & Alliston, T. N. (1998). Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol*, 145(1-2), 47-54.
- Russell, D. L., Doyle, K. M. H., Ochsner, S. A., Sandy, J. D., & Richards, J. S. (2003). Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42330-42339. doi:DOI 10.1074/jbc.M300519200
- Russell, D. L., Ochsner, S. A., Hsieh, M., Mulders, S., & Richards, J. S. (2003). Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology*, 144(3), 1020-1031. doi:10.1210/en.2002-220434
- Sabourin, L., Duenk, P., Bonte-Gelok, S., Payne, M., Lapen, D. R., & Topp, E. (2012). Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Sci Total Environ*, 431, 233-236. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.017
- Sanchez, F., Adriaenssens, T., Romero, S., & Smitz, J. (2010). Different follicle-stimulating hormone exposure regimens during antral follicle growth alter gene expression in the cumulus-oocyte complex in mice. *Biol Reprod*, 83(4), 514-524. doi:10.1095/biolreprod.109.083311
- Sandanger, T. M., Huber, S., Moe, M. K., Braathen, T., Leknes, H., & Lund, E. (2011). Plasma concentrations of parabens in postmenopausal women and self-reported use of personal care products: the NOWAC postgenome study. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 21(6), 595-600. doi:10.1038/jes.2011.22
- Soni, M. G., Carabin, I. G., & Burdock, G. A. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol*, 43(7), 985-1015. doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
- Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, 28(1), 117-149. doi:10.1210/er.2006-0022
- Warita, K., Mitsushashi, T., Sugawara, T., Tabuchi, Y., Tanida, T., Wang, Z. Y., . . . Hoshi, N. (2010). Direct effects of diethylstilbestrol on the gene expression of the cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc) in testicular Leydig cells. *Life Sci*, 87(9-10), 281-285. doi:10.1016/j.lfs.2010.06.020
- Weschler, C. J., & Nazaroff, W. W. (2014). Dermal uptake of organic vapors commonly found in indoor air. *Environ Sci Technol*, 48(2), 1230-1237. doi:10.1021/es405490a
- Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., . . . Miyamoto, K. (2013). Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 369(1-2), 42-51. doi:10.1016/j.mce.2013.02.004

8. ANEXO 1

Artículo publicado

Elena Herrera-Cogco, Bruno López-Bayghen, Dinorah Hernández-Melchor, Almena López-Luna, Cecilia Palafox-Gómez, Leticia Ramírez-Martínez, Estheisy López-Bello, Arnulfo Albores & Esther López-Bayghen (2020) Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures, *Toxicology Mechanisms and Methods*, DOI: [10.1080/15376516.2020.1741052](https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1741052)

Accepted 07 Mar 2020

Accepted author version posted online: 13 Mar 2020

Published online: 29 Mar 2020



Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures

Elena Herrera-Cogco, Bruno López-Bayghen, Dinorah Hernandez-Melchor, Almena López-Luna, Cecilia Palafox, Leticia Ramírez-Martínez, Estheisy López-Bello, Arnulfo Albores & Esther López-Bayghen

To cite this article: Elena Herrera-Cogco, Bruno López-Bayghen, Dinorah Hernandez-Melchor, Almena López-Luna, Cecilia Palafox, Leticia Ramírez-Martínez, Estheisy López-Bello, Arnulfo Albores & Esther López-Bayghen (2020): Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures, Toxicology Mechanisms and Methods, DOI: [10.1080/15376516.2020.1741052](https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1741052)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1741052>



Accepted author version posted online: 13 Mar 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures

Elena Herrera-Cogco^{1*}, Bruno López-Bayghen^{1,2*}, Dinorah Hernandez-Melchor^{1,2*}, Almena López-Luna^{1,2}, Cecilia Palafox¹, Leticia Ramírez-Martínez¹, Estheisy López-Bello¹, Arnulfo Albores^{1##}, and Esther López-Bayghen^{1##}

¹*Departamento de Toxicología, Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN. Ave. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 México City, México.*

²*Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular, Instituto de Infertilidad y Genética, Ingenes México. Carretera México-Toluca 5420 ofna. 601, Cuajimalpa de Morelos, El Yaqui, 05320 México City, México.*

* Authors contributed equally to this work; they should be considered as the first author

*CONTACT: Prof. Esther López-Bayghen Ph.D. Departamento de Toxicología, Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN;

##Corresponding authors:

Esther López-Bayghen, Ph.D., and Arnulfo Albores, Ph.D.

Departamento de Toxicología, Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN

Telephone: +52 55 5747-3800 ext. 5486

Fax: +52 55 5747-3395

Email: ebayghen@cinvestav.mx

aalbores@cinvestav.mx

Abstract

In cosmetics and food products, parabens are widely used as antimicrobial agents. Reports have suggested that parabens may be linked to infertility, owing to their effects on basal steroidogenesis properties or their capacity to inflict mitochondrial damage. Despite growing concerns about parabens as endocrine disruptors, it is unclear whether they affect any of these actions in humans, particularly at environmentally relevant concentrations. In this work, an *in vitro* primary culture of human granulosa cells was used to evaluate steroidogenesis, based on the assessment of progesterone production and regulation of critical steroidogenic genes: CYP11A1, HSD3B1, CYP19A1, and HSD17B1. The effects of two commercially relevant parabens, methylparaben (MPB) and butylparaben (BPB), were screened. Cells were exposed to multiple concentrations ranging from relatively low (typical environmental exposure) to relatively high. The effect was assessed by the parabens' ability to modify steroidogenic genes, progesterone or estradiol production, and on mitochondrial health, by evaluating mitochondrial activity as well as mtDNA content. Neither MPB nor BPB showed any effect over progesterone production or the expression of genes controlling steroid production. Only BPB affected the mitochondria, decreasing mtDNA content at supraphysiological concentrations (1000 nM). Prolonged exposure to these compounds produced no effects in neither of these parameters. In conclusion, neither MPB nor BPB significantly affected basal steroidogenesis in granulosa cells. Although evidence supporting paraben toxicity is prevalent, here we put forth evidence that suggests that parabens do not affect basal steroidogenesis in human granulosa cells.

Keywords: methylparaben, butylparaben, bisphenol A, granulosa cells, mitochondrial DNA

Introduction

Parabens, a group of molecules containing esters of parahydroxybenzoic acid, are commonly used in the cosmetic and food industries due to their ability to act as antimicrobial agents. They present several advantages over the use of other antimicrobials; they are odorless, colorless, and stable across multiple pHs and temperature ranges (Cashman and Warshaw, 2005). Even though the Food and Drug Administration has determined them safe for human usage, in the last two decades, a conflicting picture over the safety of paraben usage has emerged. Multiple reports support the notion that parabens can act as endocrine disruptors, with some authors going so far as to say that increased exposure in humans is associated with higher infertility rates (Boberg et al., 2010; Darbre and Harvey, 2008; Song et al., 1991; Wang et al., 2009). On the other hand, multiple reports have also emerged supporting the notion that these effects are either non-existent, barely significant, or only happen at doses much higher than those to which humans are exposed (Hossaini et al., 2000; Shaw and deCatanzaro, 2009; Soni et al., 2005). Therefore, controversy remains about whether parabens are toxic.

The apparent toxicity of parabens has been described at two levels: estrogenic activity and mitochondrial toxicity. Parabens have been proposed to act as estrogens by binding to the uterine estrogen receptor (ER), as demonstrated in a mouse model (Routledge et al., 1998). Moreover, parabens are shown to promote ER-dependent transcriptional activity in yeast and MCF-7 cells (Okubo et al., 2001; Routledge et al., 1998), with a side-chain length dependency. Methylparaben (MPB) is the least potent disruptor, while butylparaben (BPB) is the most potent “estrogen,” 5-fold lower than that of 17 α -estradiol (Routledge et al., 1998). *In vivo*, parabens are associated with weak estrogenic activity (6-fold lower than 17 β -estradiol) in the vitellogenin assay in fish (10 mg/kg) and in uterotrophic assays in rodents (400-600 mg/kg) (Alslev et al., 2005; Hossaini et al., 2000; Routledge et al., 1998). According to the National Toxicology Program review for BPB, the overall mean applied exposure for women is about 0.12 mg/kg (Masten, 2005), which is 80- to 5000-fold less than doses used in the *in vivo* models.

It has been posited that parabens affect the mitochondria, a possibility that has not been widely explored. Previous studies have identified defective mitochondrial function due to paraben exposure (Nakagawa and Moldeus, 1998; Nakagawa and Moore, 1999; Tavares et al., 2009). Moreover, parabens exert their antimicrobial effect by disrupting bacterial membrane respiration. Therefore, it is speculated that in eukaryotic cells, paraben exposure could lead to mitochondrial disruption. In support of this hypothesis, in

hepatocytes, parabens induced significant mitochondrial-based cytotoxicity at elevated concentrations (0.5-20 mM), with MPB being the least toxic and BPB being the most toxic, which also indicates a side-chain length dependence (Nakagawa and Moldeus, 1998). Even though the paraben concentration exceeded the concentrations routinely found in exposed women, a recent study by Szelag and colleagues (Szelag et al., 2016) showed a reduction in mitochondrial membrane potential in the human hepatic HepG2 cell line, a decrease in ATP concentration, and an increase in DNA damage leading to apoptosis, induced by propylparaben exposure at 22.2 nM, a concentration much closer to those found in humans. However, the potential effects of paraben exposure on the mitochondria at concentrations found in exposed women have yet to be investigated.

As more research on paraben toxicity emerges, the question remains whether or not these compounds are toxic, and in what tissues would these actions be affected. In this work, we decided to address this issue by evaluating the toxic capacity of parabens in a model relevant to the female reproductive system: cultured granulosa cells. This model proved useful in testing the toxicity inflicted by mitochondrial DNA damaging agents, as well as by molecules with estrogenic effects—two of the proposed mechanisms utilized by parabens. Here, using our model, we examined the steroidogenic properties and mitochondrial toxicity of two commonly used parabens, MPB, and BPB, with respect to female infertility at low-environmentally relevant concentrations.

Materials and Methods

Chemicals

Butylparaben (cat# 54680), methylparaben (cat# H6654), bisphenol A (BPA, cat# 54680), dimethyl sulfoxide (DMSO, cat# D4540), and Trypan Blue (cat# T8154) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Diethylstilbestrol (DES, cat# 500394) was purchased from Merck (Mexico City, Mexico).

Controlled Ovarian Stimulation and Oocyte Retrieval

This study was approved by the Ethics Committee of the Ingenes Institute. Written informed consent was obtained from all patients, conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Granulosa cells were collected from patients from the Ingenes Institute in Mexico City, Mexico. All patients were between 29 and 35 years old and subjected to controlled ovarian stimulation for 10 days. The controlled ovarian stimulation protocol consisted of administering a daily dose of Gonadotrophin-releasing hormone

agonists and antagonists [0.25 mg/day Cetrotide (Merck, Darmstadt, Germany) or 0.25 mg/day Ganirelix acetate (Orgalutran MSD, Kenilworth, NJ, USA)] in the luteal phase after menses. Gonadotropins were administered at variable doses with a minimal daily dose of 300 IU, adjusted for the patient's age, ovarian responsiveness, serum estradiol (E₂) levels, and vaginal ultrasound measurements of follicular diameters, which were obtained every 2 or 3 days. Stimulation was prolonged until the mean diameter of the leading follicles was >18 mm. Recombinant human Chorionic Gonadotropin (Choragon 1000 IU, Laboratoire Ferring, Saint-Prex, Switzerland) was administered, and oocyte retrieval was conducted 36 h later with ultrasound guidance. Follicles of 14–18 mm were aspirated (typically 6 to 18), and 6 to 22 oocytes were obtained with an average of 17.5 ± 3.5 oocytes per woman.

Primary culture of granulosa cells and treatments

After oocyte isolation, cumulus cells were separated from the oocyte by mechanical separation. Cumulus cells from different patients were pooled together to decrease variability among women. The cells were washed two times with phosphate-buffered saline (PBS) and then digested with 150 µl of hyaluronidase (1 mg/ml; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) for 3 min. Afterward, the cells were washed with PBS and centrifuged at 3200 rpm for 5 min. The pellet was suspended in a 50/50 mix of DMEM/F12 medium (Gibco, Grand Island, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GE Healthcare, Mexico City, Mexico) and 1% penicillin/streptomycin. Cells were counted using a hemocytometer; cell viability was determined using Trypan Blue before seeding. The cells were plated in 24-well plates (600,000 cells/well) and maintained in culture at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were photographed with a Nikon Eclipse TS100-F microscope with an MA88-500 Premiere® camera and analyzed with the TSView 7 software.

After 21 h, the media was replaced with fresh media containing 1% FBS to suppress cellular activity and 1% penicillin/streptomycin. At 24 h, the media was supplemented with 1 µM of testosterone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US), as the substrate for E₂ production, and either MPB (6, 300, 657, 1000 nM), BPB (2, 5.1, 20, 1000 nM), BPA (1.4, 8.7, 500, 1000 nM, 4.3 µM and 43 µM), DES (5000 nM), or DMSO (used as vehicle). The concentrations of these compounds were chosen based on levels measured in follicular fluid, serum, plasma, and urine (see Table 1). Fresh working solutions of all compounds were prepared for each experiment, and treatment times are indicated in each figure legend.

For the continued exposure to parabens, primary cultures of human cumulus granulosa cells were plated and treated immediately with MPB, BPB, BPA (657, 20, and 500 nM, respectively) or DMSO. Culture media was collected for measuring progesterone, and the cells were harvested at different time points (24, 48, 72, and 96 h of culture). Progesterone-related genes (CYP11A1 and HSD3B1) were assessed, and mitochondrial DNA (mtDNA) content was quantified.

Measurement of hormone levels

E₂ and progesterone concentrations (pg/ml or ng/ml) from the culture medium (100,000 cells) were measured using the VIDAS assay according to the manufacturer's instructions, using an immunoenzymatic competition assay with an automated immunoassay system (bioMérieux Marcy-l'Etoile, France) or the MAGLUMI PRG system (CLIA) in a Snibe Diagnostic MAGLUMI 800 apparatus.

RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was isolated from confluent granulosa cell cultures (treated and non-treated) and extracted using the Tri-Reagent Sigma-Aldrich and Direct-zol RNA MiniPrep kit (ZymoResearch, Irvine, CA, USA). Every treatment condition was analyzed in duplicate. Samples were subjected to one-step RT and quantitative PCR (qPCR) using the Step one Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems). qPCR was performed in a 10 µl reaction volume using KAPA SYBR FAST One-Step RT-qPCR system (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA). The reaction mixture consisted of 5 µl 2X KAPA SYBR® FAST RT-qPCR Master Mix (Woburn, MA, USA), 0.2 µl ROX, 0.2 µl dUTP (10 mM), 0.2 µl forward and reverse primers (20 µM), 0.2 µl KAPA RT, 5 ng of RNA sample, and nuclease-free water. The qPCR profile consisted of initial cDNA synthesis by M-MuLV Reverse Transcriptase at 42 °C for 5 min, and activation of the polymerase at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 3 sec, 60 °C for 30 sec. A melt curve stage was added. To quantify the expression of mRNA levels, we used oligonucleotide pairs designed by our laboratory (sequences are available upon request). For verification purposes, all the PCR products were resolved through capillary electrophoresis using the Analyzer Labchip GX (Caliper, Perkin Elmer, Alameda, CA, USA). Products showed a single band corresponding to the predicted base-pair length. The relative abundance of the target mRNA is expressed as sample versus control, normalized to HPRT expression levels, and calculated as $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Measuring mitochondrial activity by MTT assay

Mitochondrial activity was measured by the MTT assay. This method involved the reduction of the tetrazolium salt (3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) by viable cells to purple formazan and was performed according to Mosmann (Mosmann, 1983). After MPB, BPB, BPA, DES, or DMSO treatment, the culture media was replaced with new media containing MTT (5 ng/ml). Following a 2 h incubation period, the media was then replaced with DMSO in order to solubilize the formazan. The absorbance was measured at 630 nm with a microplate reader (Tecan infinite M200 Austria GmbH, Austria). Samples were normalized to protein concentration measured at 280 nm with a NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US).

mtDNA analysis

DNA was extracted from cell cultures with the All-In-One Mini-Preps Kit (Bio Basic Canada Inc.) according to the manufacturer's instructions. mtDNA quantitative analysis of granulosa cells was performed using the one-step qPCR and SYBR-Green (2X KAPA SYBR® FAST qPCR Universal Master Mix; Woburn, MA, USA). A portion of the mitochondrial D-loop and Interleukin 6 (IL6) nuclear gene was amplified in order to perform a correlation between the amounts of mtDNA concerning the number of cells in each culture. Primers were designed for the *Homo sapiens* mitochondrial D-loop segment (sequences are available upon request). For each qPCR assay, a negative control (no template sample) and a quantitative control (two different concentrations of DNA for a single sample) were included. The identities of the amplicons were confirmed by direct cloning (CloneJET PCR Cloning Kit from Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) and automated sequencing (BigDye direct sequencing kit from Thermo Scientific).

Total DNA was extracted from granulosa cell cultures using the All-In-One DNA/RNA Miniprep Kit from Bio Basic (Ontario, Canada). The conditions for amplification were as follows: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 3 sec and 62°C for 30 sec. A melting curve analysis was performed. To compare mtDNA quantities between samples, the $\Delta\Delta C_t$ method was used to compare results from experimental samples with both a calibrator (untreated control) and a normalizer housekeeping gene. The fold difference ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) was calculated for each sample. For this normalization, the untreated

controls display a value of 1, whereas values higher or lower than 1 represent those experimental samples that contain higher or lower quantities of mtDNA, respectively.

Immunostaining

Granulosa cells were grown on poly-lysine-coated wells Lab-Tek Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific), in the same culture conditions as described above for 48 h. Cells were fixed in cold 4% paraformaldehyde for 10 minutes and washed once with 1X PBS. After washing, cells were treated for 10 minutes with a blocking and permeability buffer (IF-buffer: 1X PBS, 0.1% Triton X-100, 0.02% SDS, 10mg/ml BSA). Affinity-purified rabbit anti-CYP11A1 antibody (Novus Biologicals, USA) was diluted (1:25), and affinity-purified mouse anti-LHCGR antibody (Novus Biologicals, USA) was diluted (1:50) in IF-buffer. Specimens were incubated at 4°C overnight with the primary antibodies in a humidified chamber. The detection of the primary antibody was done after 1 h incubation in a humidified chamber with anti-rabbit or anti-mouse (1:75) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC). Control of immunolabeling was performed with the same staining procedure but without the primary antibodies. After incubation, 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) was used for nuclei counterstaining and Fluoroshield (Sigma) as a mounting medium. The fluorescence was examined using a confocal microscope (Leica TCS SP8) and an oil 63X objective with and without zoom (2x) and the LAS AF software (Leica) for image capture and analysis.

Statistical analysis

Data are presented as a mean \pm standard error (S.E.). Differences between groups were determined by one-way or two-way ANOVA with a *post hoc* Dunn's or Bonferroni's test. P-values <0.05 (two-tailed) were considered statistically significant. All statistical analyses were calculated with the Sigma Plot 12 Software v.12 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Results

Cultured human granulosa cells exhibit a mural-like phenotype

Cumulus cells were isolated and pooled from healthy women undergoing *in vitro* fertilization for male factor infertility. As shown in Figure 1A, 18 h after plating, their cellular morphology was rounded; however, after 48 h, the cellular morphology was more typical of mural granulosa cells (Bruckova et al., 2008). A feature reported for mural granulosa cells is the production and accumulation of progesterone in the culture media (Bruckova et al., 2008); therefore, the culture media was also collected and analyzed by immunofluorescent assay. Progesterone levels increased by 80% within 24 h and 150% by 48 h (Figure 1B, $p < 0.05$). On the other hand, estrogen remained statistically unperturbed. Initially, the pooled sample presented the typical cumulus cell markers: *PTGS2* and *HAS2*. The prolonged culture was associated with increased expression of *LHCGR* and *CYP11A1* (mural granulosa markers) and decreased expression of *PTGS2* and *HAS2* (Figure 1C). By 18 h, both an increase in mural cell phenotype markers and a decrease in cumulus cell phenotype markers were apparent. After 48 h, cells were expressing on average, 24-fold more *CYP11A1* as well as 16-fold more *LHCGR*. Conversely, by 48 h of culture, *HAS2* expression decreased to half, while *PTGS2* expression was almost undetectable. Additionally, staining the cell culture with anti-*CYP11A1* and anti-*LHCGR* antibodies indicated that all cells exhibit the mural phenotype, as 96.2% and 92.3% of the cells were positive at 48h, respectively (Figure 2). Overall, these characteristics are all consistent with a culture of luteinized mural granulosa cells.

The effect of BPA and DES on basal steroidogenesis activity of cultured granulosa cells

Endocrine disruptors exert their activity on hormone production by regulating the enzymes involved at the gene expression level. In order to test our system, we decided to evaluate the effect BPA and DES had on progesterone and E_2 production under conditions in which estrogenic activity should be modified. After 24 h of cell culture, followed by 24 h of either BPA or DES treatment, cells were harvested, and hormone production was measured. As expected, DES (5 μM) induced a 50% decrease in progesterone production, as compared to control. BPA applied at 4.3, and 43 μM [previously reported (Mansur et al., 2016)] also induced a significant decrease in progesterone production. E_2 production was unaffected by all compounds (Figure 3A).

The expression of two genes involved in progesterone production, *CYP11A1* and *HSD3B1*, and two genes involved in E_2 production, *CYP19A1*, and *HSD17B1*, were

examined. When BPA was applied at 4.3 and 43 μ M, there was a significant down-regulation of *CYP11A1* and *HSD3B1*; however, *CYP19A1* only significantly decreased when 43 μ M was used ($p < 0.05$). Exposure to DES was also associated with over 50% decrease in *HSD3B1* gene expression, *CYP11A1* remained unaltered, and 40-50% reduction in *CYP19A1* and *HSD17B1* gene expression ($p < 0.05$, Figure 3, panels B and C).

The steroidogenic activity of parabens in cultured granulosa cells

Parabens have been proposed to act like estrogens. We decided to evaluate the effect over the basal steroidogenesis of these compounds in cultured granulosa cells using concentrations found in environmentally exposed women. After 24 h of cell culture, followed by 24 h of paraben treatment, cells were harvested and measured for progesterone and E_2 production, as well as the expression of key steroidogenic enzymes. MPB and BPB exposure did not decrease progesterone production, even at the highest concentration tested (Figure 4). BPA, up to the highest reported concentrations found in exposed women, did not induce any changes in progesterone production. E_2 production was unaffected by all compounds. Moreover, there were no significant increases or decreases in *CYP11A1*, *HSD3B1*, *CYP19A1*, and *HSD17B1* when the cells were treated with MPB, BPB, or BPA (Figure 5).

The effect of parabens on basal steroidogenesis and mtDNA content in cultured granulosa cells after 96h of exposure

Parabens have been shown to induce mitochondrial toxicity; however, this has never been explored at the level of mtDNA content. mtDNA content was evaluated using a PCR-based assay. MPB showed no effect on mtDNA content, while BPB at a concentration of 20 nM and 1000 nM caused a 24% and 37% decrease of mtDNA, respectively ($p < 0.05$, Figure 6A). As expected, BPA caused a 40% decrease of mtDNA at 8.7 nM to 43 μ M (Figure 6A and 6C). DES did show a clear effect on mtDNA content. After 24 h of treatment, none of the compounds tested (MPB, BPB, BPA, and DES) showed a significant effect on mitochondrial activity, as measured by the MTT assay (Figure 6B).

Continue exposure with parabens: quantitative expression analysis of crucial steroidogenic genes and mtDNA content

To rule out exposure time, we analyzed the prolonged effect of parabens with continuous exposure starting from the initial seeding. For this exposure, we decided to use those concentrations that were environmentally relevant, and the highest reported (see Table 1). An MTT analysis was performed to determine mitochondrial activity. As expected, DMSO showed a steady activity throughout the time interval, indicating that DMSO did not affect the mitochondrial activity of the cells; similarly, no effect was observed by parabens or BPA exposure when compared against DMSO at each time (Figure 7A). mtDNA was quantified using qPCR and as can be observed in Figure 7B. mtDNA content was not affected due to parabens or BPA exposure. Then, to analyze the prolonged effect of parabens on basal steroidogenesis, the expression of *CYP11A1* and *HSD3B1* was measured at different time points after exposure using RT-qPCR. The only significant and expected decrease of *CYP11A1* expression was observed at 96 hours of BPA exposure when compared with DMSO. *HSD3B1* did not show significant changes when exposed to parabens or BPA (Figure 7C and 7D). Finally, progesterone production increased over time following the characteristic behavior of the culture, regardless of parabens or BPA exposure (Figure 7E).

Discussion

Parahydroxybenzoic acid derivatives, or parabens, are molecules widely used as preservatives for their antimicrobial properties. However, parabens' capacity to induce toxic effects within the female reproductive system has become the subject of a heated debate. One of the main issues is the discrepancy between the concentrations at which parabens demonstrate biologic effects and the concentrations at which these compounds are found in biological samples. In this work, we decided to address this issue by evaluating the toxic capacity of parabens in a model relevant to the female reproductive system: cultured mural granulosa cells.

Cultured mural granulosa cells are a model that can be used to screen for toxic effects of the female reproductive system, an idea that was initially proposed by Hughes and colleagues. In their studies, they demonstrate that human obtained cultured granulosa cells produce progesterone but not estrogen. They also showed that cultured granulosa cells respond to molecules with estrogenic activity, such as 17 β -estradiol or clomiphene

citrate, inducing a decrease in progesterone production (Hughes et al., 1990). Therefore, we decided to expand upon this idea but taking into consideration the cell's phenotype. *In vivo*, granulosa cells exhibit two phenotypes, cumulus and mural. Cultured human granulosa cells are typically obtained from the follicular fluid, and their phenotype, whether cumulus or mural, has not been extensively characterized. By using cells obtained by decumulation, we started with a highly enriched sample of cumulus cells. After seeding these cells, we monitored the expression of critical transcription markers for each phenotype. Here, we show a concomitantly increased expression of *CYP11A1* and *LHCGR*, markers for mural cell phenotype, with decreased expression of *PTGS2* and *HAS2*, markers for the cumulus cells phenotype. These observations, coupled with the observed increase in progesterone production and positive immunostaining for *CYP11A1* and *LHCGR*, support the notion that these cultured cells are mural granulosa cells. To our knowledge, this resulted in having the best-characterized mural primary culture to analyze the differentiation process from cumula to mural granulosa.

Granulosa cell cultures obtained during *in vitro* fertilization can vary and may represent the differentiated stages found in the ovary. Recently, Baumgarten et al. cultured cumula cells with lower expression of *CYP11A1*, *STAR*, and *LHR* in cumulus than in mural and concluded that these cells were not luteinized, representing undifferentiated granulosa cells. For them to achieve this, a covering matrix, mechanical disaggregation, and FSH supplemented culture conditions were used (Baumgarten et al., 2014). In contrast, our culture conditions include the use of hyaluronidase for disaggregation (not mechanical), FBS supplementation, no matrix coated surfaces, and no FSH was included during the culture procedure. All these factors provide adequate conditions to differentiate from cumula to mural cells, as it is evident for the continuous increase in progesterone production, *CYP11A1*, and *LHR* expression, setting the conditions to analyze the differentiation process toward mural luteinized cells.

As a proof of concept and to confirm that this cell model was responding to hormonal perturbations, we tested the effects of two treatments with proven estrogenic effects at high doses: DES, a proven xenoestrogen (Warita et al., 2010), and BPA (Mansur et al., 2016). DES significantly decreased the expression of *HSD3B1*, a rate-limiting enzyme for progesterone synthesis. Furthermore, DES inhibited progesterone production. As shown before by Mansur and colleagues, BPA blocks progesterone production (Mansur et al., 2016), and we show here that BPA affects explicitly *CYP11A1* and *HSD3B1* expression, which is involved in progesterone production. This supports the idea that these

cells are capable of responding to molecules with known estrogenic capacity that also affect the basal steroidogenesis.

Differing responses to BPA can be observed between luteinized and non-luteinized cultured granulosa cells, the main difference being the level of differentiation. In a model of preantral granulosa cells, considered to be de-differentiated due to their response to FSH stimulus, BPA increased progesterone production (Pogrmic-Majkic et al., 2019). On the contrary, BPA decreased progesterone production when the cultured granulosa cells were luteinized (Kwintkiewicz et al., 2010; Mansur et al., 2016), which was observed in the present study. Such differences in progesterone synthesis may not only account from the level of differentiation of the granulosa cells treated with BPA but the concentration as well (Mlynarčíková et al., 2005; Zhou et al., 2008). BPA at high doses decreased progesterone levels, both under basal and under FSH-stimulated conditions in rats and mice (Peretz and Flaws, 2013; Peretz et al., 2010; Samardzija et al., 2018). However, these results are in disagreement with those obtained in human cumulus granulosa cells (Pogrmic-Majkic et al., 2019). Moreover, there seem to be different levels of susceptibility among cellular models, since a clear BPA concentration threshold between progesterone induction and inhibition cannot be distinguished.

One main contributor to the current controversy surrounding paraben toxicity is the many different concentrations used by studies on this topic. For example, BPB has been used with many *in vitro* studies at concentrations ranging from 250 nM to 100 μ M, showing estrogenic properties at concentrations of 50 μ M (Byford et al., 2002; Darbre and Harvey, 2008; Okubo et al., 2001). Furthermore, with *in vivo* studies, BPB shows estrogenic effects at exposures from 10 to 600 mg/kg (Alslev et al., 2005; Hossaini et al., 2000; Routledge et al., 1998). However, according to the National Toxicology Program, the average exposure for the woman is about 0.12 mg/kg (Masten, 2005). These discrepancies prompted us to investigate the effects of parabens in an *in vitro* model at the low concentrations found in fluids of environmentally exposed women. Two parabens were chosen for this study: MPB, which is considered a “weak” paraben, and BPB, which is considered a “strong” paraben. This denomination was given on the fact that paraben estrogenic activity is dependent on side-chain length (Pugazhendhi et al., 2005). For testing these compounds, four concentrations were chosen. The lowest concentration was reported to be the typical concentration found in serum, blood, or urine, whereas the second concentration was the highest reported in human samples found in our literature review. The third concentration

was an arbitrarily high concentration, higher than the previous concentrations by at least one order of magnitude, while the last concentration was 1 μM , which was an extremely high concentration and meant to force the model system into responding if such an effect was present (see Table 1). It is worth noting that studies analyzing parabens' estrogenic activity, commonly utilize concentrations ten-fold to a thousand-fold higher than those found in human biological fluids (see Table 1).

Using concentrations that are found in women exposed to parabens, we decided to evaluate whether parabens exerted any steroidogenic activities in our cell culture model at two endpoints: gene expression of rate-limiting steroidogenic enzymes and hormone levels in the media. We considered these two endpoints because, while gene expression would be very sensitive, hormone accumulation in the culture media would be more robust. Therefore, these two methods could compensate for artifacts created in the other. Neither MPB nor BPB exerted any effect at any concentration. This is supported by other reports, which have tested paraben activity in cultured granulosa cells that found no effect at similar concentrations (Guerra et al., 2016; Mansur et al., 2016).

Interestingly, BPA, which is widely considered a reproductive toxicant (Maffini et al., 2006), also did not exert activity at the concentrations tested. Accordingly, others have found BPA failed to induce an effect on cultured cells at similar concentrations (up to μM concentrations) and showed an effect only at very high concentrations (Mansur et al., 2016).

In a current study by Lillo and colleagues, MPB was shown to increase tumor size of MCF-7 xenografts and ER+ patient-derived xenograft tumors; however, this effect was only observed using MPB pellets of 4 μg per day, a significantly higher dose than that measured in breast tissue (Lillo et al., 2017a). Nonetheless, the same research group determined that *in vitro* exposure of MCF-7 cells to MPB (10 nM) (Lillo et al., 2017a) or BPA (1 and 10 nM) (Lillo et al., 2017b) failed to increase MCF-7 cell proliferation or induction of canonical estrogen-responsive genes (pS2 and progesterone receptor PGR). Both MPB and BPA were able to induce Sox2, a canonical stem cell marker, at environmentally relevant levels (10 nM). However, the principal interest of those two studies was to determine the capability of MPB and BPA to promote tumor proliferation, whereas our study focused on the effect in the basal steroidogenesis of mural granulosa cells as a possible cause of female infertility. Research on the effect of parabens on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis, using a rat model at supraphysiological doses (100 mg/kg/day), concluded that parabens suppressed steroidogenesis by down-

regulating steroidogenic enzymes (Ahn et al., 2012; Lee et al., 2017); however, this was not proven using environmentally relevant concentrations of parabens. In contrast, our work focuses on the effect of parabens in basal steroidogenesis using previously reported levels in a primary culture of human mural granulosa cells.

Parabens have been proposed to exert mitochondrial toxicity. Tavares and colleagues (Tavares et al., 2009) proposed three main intra-mitochondrial targets for drug-induced mitochondrial dysfunction: 1) the mitochondrial respiratory chain, 2) the mitochondrial permeability transition pore, and 3) mtDNA. The mitochondria were evaluated due to their essential role in the bioenergetics of granulosa cells and because estrogen receptors are present in mitochondria (Chen et al., 2004; Monje and Boland, 2001). The number of copies of mtDNA varies according to the bioenergetic needs of each tissue and can range over 3-fold, depending on the type of cell (Garcia-Rodriguez, 2007). mtDNA copy number is a useful indicator of a cell's competency to use oxidative phosphorylation to generate ATP (St John, 2016) since the expression of mtDNA genes can only occur when mtDNA is continuously replicated (Trounce et al., 2000). Interestingly, none of the previous studies focused on the effect parabens could have on mtDNA content. Here, we show that MPB exposure did not affect mtDNA. On the contrary, BPB did reduce the amount of mtDNA at concentrations that could be found in exposed women (20 nM). BPA, another endocrine disruptor that has been compared with parabens, showed significant ability to reduce mtDNA content, which is in agreement with other *in vitro* and *in vivo* studies in which BPA has been shown to reduce ATP production, induce oxidative stress, dissipate mitochondrial membrane potential, and decrease mitochondrial respiratory complex activity in a dose- and time-dependent manner (Barbonetti et al., 2016; Jiang et al., 2015; Kaur et al., 2014; Kovacic, 2010; Nakagawa and Tayama, 2000; Ooe et al., 2005; Singh et al., 2015). This underscores the relevance of researching the effects parabens have on the mitochondria, particularly concerning mtDNA content in cell models at environmentally relevant concentrations.

One limitation of this model may be the origin of these cells. Although they come from healthy, fertile women (donors and women undergoing treatment for male infertility), these women have been exposed to parabens for most of their lives. That is to say, and these cells may not be naïve to parabens or other, far more potent estrogens, such as E₂ and 17β-estradiol. We posit that this difference will be critical. Studies exploring parabens' estrogenic activity in infant rats have found that lower concentrations can display estrogenic effects. Therefore, it is necessary to consider research regarding juvenile and

adult effects of parabens as separate avenues. However, regarding the research in our model of adult human granulosa cells, parabens exerted no effects on basal steroidogenesis at the environmentally relevant concentrations in a short- or prolonged exposure.

Our study supports the notion that more research is necessary to understand the effects of parabens on human biology. Although the negative response over basal steroidogenesis obtained in this mural cellular model, paraben's xenoestrogenicity still requires investigations. Several arguments support this proposal. Parabens are used as a preservative in many beauty and hygiene products. In México, about 100 million inhabitants (79.2% of the total population) have used at least one product containing them during their lifetime (Canipe, 2017). Moreover, in cosmetics, parabens are one of the chemicals in the product-formulation mixture; thus, interactions will most likely occur. Also relevant is that women reach the highest consumption/exposure at the reproductive age when they could be more susceptible to steroidogenic effects considering hormonal stage (Chan et al., 2015). Lastly, for toxicological studies, the influence of first step modification respect to parent parabens, considering that parabens are applied on the skin where climatic factors, as well as the metabolic processes, may produce changes in the parent structure, and may potentially produce steroidogenic intermediaries (Boberg et al., 2010).

Conclusions

Parabens do not appear to be toxic to granulosa cells, as demonstrated in an *in vitro* model at environmentally relevant concentrations found in exposed women. Cultured granulosa cells obtained from decumulation presented with a mural-like phenotype and can be used to screen for the estrogenic and steroidogenic activity of compounds. This activity can be measured at either the gene expression level of key steroidogenic enzymes or progesterone production and accumulation in the cell culture media; however, MPB or BPB seemed to affect neither. Finally, mitochondrial toxicity, at the level of mtDNA content, can also be screened in this system, as it showed an apparent response to BPA and DES. Interestingly, MPB did not exert this toxic effect, while BPB did.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to the participants of this study. We are grateful for the technical assistance from the staff of the Ingenes Institute, Laboratorio General, in progesterone determinations, especially María Azucena Rubio Morales, Martha Cecilia Hernández Morales, and Rosa Isela Morales Chávez; Jeimy Pedraza from the Laboratorio de Fertilización *In Vitro*; as well as Azucena Ocampo, Paola Olvera, and Luz Maria Escobar for cumula cell collection. We are also grateful to the technical assistance of Dr. Irais Poblete-Naredo and to Dr. Leonardo M. Porchia, for their contribution in the discussion and to the critical reading of this manuscript. This study was supported in part by grants to ELB from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt-PEI 212650 and 231793). EHC, BLB, DHM, AL, CP, and EL were recipients of Conacyt/SNI scholarships. Funding source(s) had no involvement in publication decisions.

References

- Ahn, H.J., An, B.S., Jung, E.M., Yang, H., Choi, K.C., Jeung, E.B., 2012. Parabens inhibit the early phase of folliculogenesis and steroidogenesis in the ovaries of neonatal rats. *Mol Reprod Dev* 79, 626-636.
- Alslev, B., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2005. Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed via food and water. *Aquat Toxicol* 72, 295-304.
- Barbonetti, A., Castellini, C., Di Giammarco, N., Santilli, G., Francavilla, S., Francavilla, F., 2016. In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction. *Reprod Toxicol* 66, 61-67.
- Baumgarten, S.C., Convissar, S.M., Fierro, M.A., Winston, N.J., Scoccia, B., Stocco, C., 2014. IGF1R signaling is necessary for FSH-induced activation of AKT and differentiation of human Cumulus granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 99, 2995-3004.
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., Hass, U., 2010. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* 30, 301-312.
- Bruckova, L., Soukup, T., Moos, J., Moosova, M., Pavelkova, J., Rezabek, K., Visek, B., Mokry, J., 2008. The cultivation of human granulosa cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 51, 165-172.
- Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G., Pope, G.S., Sauer, M.J., Darbre, P.D., 2002. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 49-60.
- Canipe, 2017. ¿Cuál es el empleo de estos compuestos en México? Cámara Nacional de la Industria de Productos Cosméticos.
- Cashman, A.L., Warshaw, E.M., 2005. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis* 16, 57-66; quiz 55-56.

Chan, L.M., Chalupka, S.M., Barrett, R., 2015. Female college student awareness of exposures to environmental toxins in personal care products and their effect on preconception health. *Workplace Health Saf* 63, 64-70.

Chen, J.Q., Delannoy, M., Cooke, C., Yager, J.D., 2004. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E1011-1022.

Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2008. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol* 28, 561-578.

Garcia-Rodriguez, L.J., 2007. Appendix 1. Basic properties of mitochondria. *Methods Cell Biol* 80, 809-812.

Guerra, M.T., Furlong, H.C., Kempinas, W.G., Foster, W.G., 2016. Effects of in vitro exposure to butylparaben and di-(2 ethylhexyl) phthalate, alone or in combination, on ovarian function. *J Appl Toxicol* 36, 1235-1245.

Hossaini, A., Larsen, J.J., Larsen, J.C., 2000. Lack of oestrogenic effects of food preservatives (parabens) in uterotrophic assays. *Food Chem Toxicol* 38, 319-323.

Hughes, S.F., Haney, A.F., Hughes, C.L., Jr., 1990. Use of human cumulus granulosa cells for in vitro screening of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 4, 11-15.

Jiang, Y., Xia, W., Yang, J., Zhu, Y., Chang, H., Liu, J., Huo, W., Xu, B., Chen, X., Li, Y., Xu, S., 2015. BPA-induced DNA hypermethylation of the master mitochondrial gene PGC-1alpha contributes to cardiomyopathy in male rats. *Toxicology* 329, 21-31.

Kaur, K., Chauhan, V., Gu, F., Chauhan, A., 2014. Bisphenol A induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphoblasts from children with autism and unaffected siblings. *Free Radic Biol Med* 76, 25-33.

Kovacic, P., 2010. How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: metabolism, electron transfer and oxidative stress. *Med Hypotheses* 75, 1-4.

Kwintkiewicz, J., Nishi, Y., Yanase, T., Giudice, L.C., 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells. *Environ Health Perspect* 118, 400-406.

Lee, J.H., Lee, M., Ahn, C., Kang, H.Y., Tran, D.N., Jeung, E.B., 2017. Parabens Accelerate Ovarian Dysfunction in a 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Induced Ovarian Failure Model. *Int J Environ Res Public Health* 14.

Lillo, M.A., Nichols, C., Perry, C., Runke, S., Krutilina, R., Seagroves, T.N., Miranda-Carboni, G.A., Krum, S.A., 2017a. Methylparaben stimulates tumor initiating cells in ER+ breast cancer models. *J Appl Toxicol* 37, 417-425.

Lillo, M.A., Nichols, C., Seagroves, T.N., Miranda-Carboni, G.A., Krum, S.A., 2017b. Bisphenol A Induces Sox2 in ER(+) Breast Cancer Stem-Like Cells. *Horm Cancer* 8, 90-99.

Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2006. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol* 254-255, 179-186.

Mansur, A., Adir, M., Yerushalmi, G., Hourvitz, A., Gitman, H., Yung, Y., Orvieto, R., Machtinger, R., 2016. Does BPA alter steroid hormone synthesis in human granulosa cells in vitro? *Hum Reprod* 31, 1562-1569.

Masten, S.A., 2005. Butylparaben [CAS No. 94-26-8] Review of Toxicological Literature, In: Program, N.T. (Ed.), Integrated Laboratory Systems, Inc., , Research Triangle Park, North Carolina.

Mlynarčíková, A., Kolena, J., Ficková, M., Scsuková, S., 2005. Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate. *Molecular and cellular endocrinology* 244, 57-62.

Monje, P., Boland, R., 2001. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem* 82, 467-479.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Nakagawa, Y., Moldeus, P., 1998. Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 55, 1907-1914.

Nakagawa, Y., Moore, G., 1999. Role of mitochondrial membrane permeability transition in p-hydroxybenzoate ester-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 58, 811-816.

Nakagawa, Y., Tayama, S., 2000. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes. *Arch Toxicol* 74, 99-105.

Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I., 2001. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERalpha and PR. *Food Chem Toxicol* 39, 1225-1232.

Ooe, H., Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M., Ariga, H., 2005. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A-induced cell injury by DJ-1. *Toxicol Sci* 88, 114-126.

Peretz, J., Flaws, J.A., 2013. Bisphenol A down-regulates rate-limiting Cyp11a1 to acutely inhibit steroidogenesis in cultured mouse antral follicles. *Toxicology and applied pharmacology* 271, 249-256.

Peretz, J., Gupta, R.K., Singh, J., Hernández-Ochoa, I., Flaws, J.A., 2010. Bisphenol A impairs follicle growth, inhibits steroidogenesis, and downregulates rate-limiting enzymes in the estradiol biosynthesis pathway. *Toxicological Sciences* 119, 209-217.

Pogrmic-Majkic, K., Nenadov, D.S., Fa, S., Stanic, B., Pjevic, A.T., Andric, N., 2019. BPA activates EGFR and ERK1/2 through PPAR γ to increase expression of steroidogenic acute regulatory protein in human cumulus granulosa cells. *Chemosphere* 229, 60-67.

Pugazhendhi, D., Pope, G.S., Darbre, P.D., 2005. Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *J Appl Toxicol* 25, 301-309.

Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicology and applied pharmacology* 153, 12-19.

Samardzija, D., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Stanic, B., Jasnica, J., Andric, N., 2018. Bisphenol A decreases progesterone synthesis by disrupting cholesterol homeostasis in rat granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology* 461, 55-63.

Shaw, J., deCatanzaro, D., 2009. Estrogenicity of parabens revisited: impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice. *Reprod Toxicol* 28, 26-31.

Singh, R.P., Shafeeque, C.M., Sharma, S.K., Pandey, N.K., Singh, R., Mohan, J., Kolluri, G., Saxena, M., Sharma, B., Sastry, K.V., Kataria, J.M., Azeez, P.A., 2015. Bisphenol A reduces fertilizing ability and motility by compromising mitochondrial function of sperm. *Environ Toxicol Chem* 34, 1617-1622.

Song, B.L., Peng, D.R., Li, H.Y., Zhang, G.H., Zhang, J., Li, K.L., Zhao, Y.Q., 1991. Evaluation of the effect of butyl p-hydroxybenzoate on the proteolytic activity and membrane function of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 91, 435-440.

Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A., 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol* 43, 985-1015.

St John, J.C., 2016. Mitochondrial DNA copy number and replication in reprogramming and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 52, 93-101.

Szelag, S., Zablocka, A., Trzeciak, K., Drozd, A., Baranowska-Bosiacka, I., Kolasa, A., Goschorska, M., Chlubek, D., Gutowska, I., 2016. Propylparaben-induced disruption of energy metabolism in human HepG2 cell line leads to increased synthesis of superoxide anions and apoptosis. *Toxicol In Vitro* 31, 30-34.

Tavares, R.S., Martins, F.C., Oliveira, P.J., Ramalho-Santos, J., Peixoto, F.P., 2009. Parabens in male infertility-is there a mitochondrial connection? *Reprod Toxicol* 27, 1-7.

Trounce, I., Schmiedel, J., Yen, H.C., Hosseini, S., Brown, M.D., Olson, J.J., Wallace, D.C., 2000. Cloning of neuronal mtDNA variants in cultured cells by synaptosome fusion with mtDNA-less cells. *Nucleic Acids Res* 28, 2164-2170.

Wang, L.Y., Wang, D.H., Zou, X.Y., Xu, C.M., 2009. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B* 10, 483-492.

Warita, K., Mitsushashi, T., Sugawara, T., Tabuchi, Y., Tanida, T., Wang, Z.Y., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Miki, T., Takeuchi, Y., Hoshi, N., 2010. Direct effects of diethylstilbestrol on the gene expression of the cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc) in testicular Leydig cells. *Life Sci* 87, 281-285.

Zhou, W., Liu, J., Liao, L., Han, S., Liu, J., 2008. Effect of bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology* 283, 12-18.

Accepted Manuscript

Figure legends

Figure 1. Granulosa cells in culture exhibit a mural cell phenotype. **A)** Cumulus-oocyte complexes isolated from patients undergoing *in vitro* fertilization were obtained, and cumulus cells were cultured for up to 48 h. Cells were photographed by contrast phase microscopy (100X). Representative images of at least three independent cultures are shown. **B)** At the indicated times, the cell culture media was collected, and the concentration of progesterone and estradiol was determined. Average progesterone concentrations went from 2057 ng/ml (18 h) to 5434 ng/ml (48 h) per 100,000 seeded cells. Average estradiol concentrations went from 390 pg/ml at 18 h to 310 pg/ml at 48 h per 100,000 seeded cells and are expressed as a percent of control (18 h values). **C)** The cultured granulosa cells were harvested with the Tri-Reagent at the indicated times. RNA was obtained and analyzed by RT-qPCR for detecting the expression of genes associated with the cumulus or mural cell phenotype. HPRT1 was used as the reference gene. Data are expressed as fold expression relative to 0 h (uncultured cells). Data were analyzed by ANOVA followed by a *post hoc* Dunn's test (n = 3 or 4). * p<0.05 (two-tailed). Data are mean ± S.E.

Figure 2. CYP11A1 and LHCGR expression in human granulosa cells. Granulosa cells were cultured for 48 h and immunostained with anti-CYP11A1 (dilution 1:25, Novus Biologicals, USA, green) or anti-LHCR (dilution 1:50, Novus Biologicals, USA, green), and nuclei were stained with DAPI (blue). Images were obtained with a Leica confocal microscope and using the LAS AF software. Mean percentages ± S.E. of CYP11A1- and LHCGR-positive cells from at least three randomly selected fields are shown on the left side, below the antibody name.

Figure 3. BPA and DES exposure affects steroid hormone synthesis and gene expression. Granulosa cells, cultured for 24 h, were exposed at the indicated concentrations of BPA and DES. After 24 h, the cell culture media was collected, and the concentration of progesterone and estradiol was determined. Average progesterone concentrations were 4357 ng/ml for DMSO control per 100,000 seeded cells. Average estradiol concentrations were 310 pg/ml for DMSO control per 100,000 seeded cells. Data are expressed as percent of control (DMSO). Cell viability is expressed as percent

comparing to cell viability in DMSO treated cells **(A)** or RNA isolated from the cells was assessed for gene expression by RT-qPCR **(B and C)**. Results are presented as fold expression relative to DMSO-treated cells. Data are mean \pm S.E. (n=3). Data were analyzed by ANOVA with a *post hoc* Dunn's test. * $p < 0.05$ (two-tailed).

Figure 4. Paraben exposure does not affect steroid hormone synthesis. Granulosa cells cultured for 24 h were exposed at the indicated concentrations of MPB, BPB, BPA, or DMSO (control). After 24 h, the culture media was collected, and the concentration of progesterone and estradiol was determined. The average progesterone is 4791 ng/ml in DMSO control per 100,000 seeded cells. Average estradiol in DMSO control is 284 pg/ml per 100,000 seeded cells, ng/ml per 100,000 cells). No significant changes were observed as a result of paraben treatment. Results are presented as folds expression relative to control (DMSO). Data are mean \pm S.E. (n=3). Data were analyzed by ANOVA with a *post hoc* Dunn's test. * $p < 0.05$ (two-tailed).

Figure 5. Paraben exposure does not affect the expression of key genes involved in steroidogenesis. Granulosa cells cultured for 24 h were exposed to the indicated concentrations of MPB, BPB, BPA, and DMSO (control). After 24 h, cells were harvested with the Tri-Reagent. RNA was obtained and analyzed by RT-qPCR for genes involved in progesterone synthesis (*CYP11A1*, *HSD3B1*) and estradiol synthesis (*CYP19A1*, *HSD17B1*). *HPRT1* was used as the reference gene. Results are presented as fold expression relative to control. Data are mean \pm S.E. (n=3). Data were analyzed by ANOVA with a *post hoc* Dunn's test. * $p < 0.05$ (two-tailed).

Figure 6. Paraben exposure decreases mtDNA content. Granulosa cells cultured for 24 h were exposed to the indicated concentrations of MPB, BPB, BPA, DES, and DMSO (control). After 24 h, cells were harvested with lysis buffer to quantify mtDNA content via qPCR **(A, C)** or analyzed for mitochondrial activity using the MTT assay **(B)**. Results are presented as a percent of control. Data are mean \pm S.E. (n=6). Data were analyzed by ANOVA with a *post hoc* Dunn's test. * $p < 0.05$ (two-tailed).

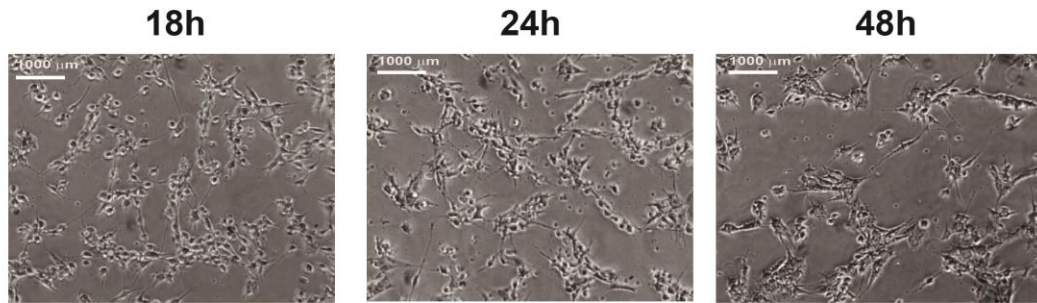
Figure 7. Effects of parabens continued exposure. Primary cultures of granulosa cells were exposed to MPB, BPB, or BPA (657, 20, and 500 nM, respectively) and harvested at

indicated time points. **A.** Mitochondrial activity was estimated by MTT analysis. **B.** mtDNA content was determined by the quantification of mitochondrial D-loop using qPCR. **C** and **D.** CYP11A1 and HSD3B1 expression determined by RT-qPCR. **E.** Progesterone production was measured with CLIA immunoassays DMSO (the averages ranged from 3358 ng/ml at 24 h to 14044 ng/ml at 96 h per 100,000 seeded cells); for 657 nM MPB (the averages ranged from 3939 ng/ml at 24 h to 12790 ng/ml at 96 h per 100,000 seeded cells), 20 nM BPB (the averages ranged from 2550 ng/ml at 24 h to 13027 ng/ml at 96 h per 100,000 seeded cells), and 500 nM BPA (the averages ranged from 2872 ng/ml at 24 h to 14098 ng/ml at 96 h per 100,000 seeded cells). In all cases, data were normalized against its control (DMSO, 24 h). Data are expressed as percentage of control. Significant differences were determined by two-way ANOVA analysis with multiple comparisons of compounds against DMSO within each time point, followed by Bonferroni's post-hoc test, * $p < 0.05$. Results are presented as mean \pm S.E. from at least three independent experiments in duplicates.

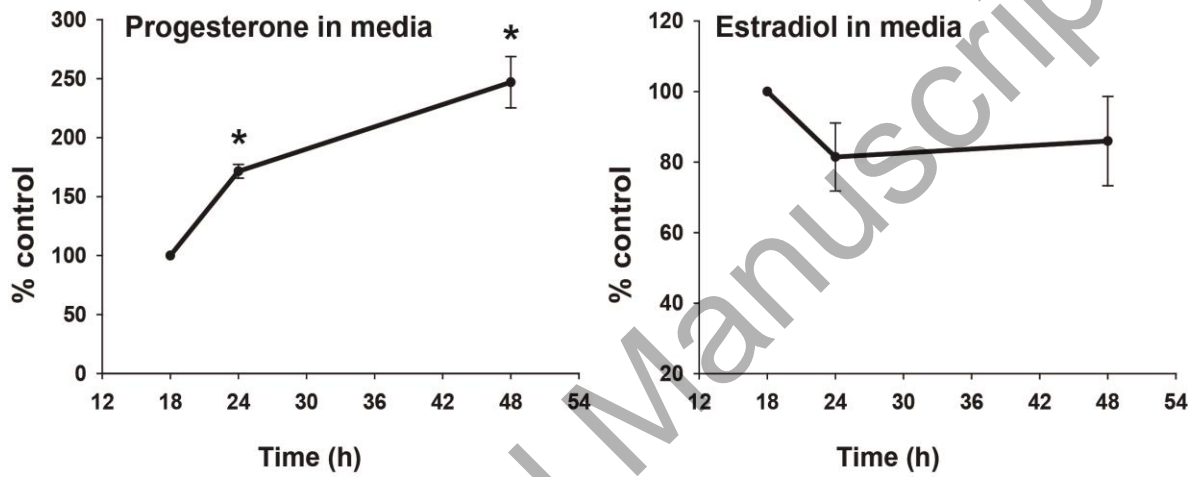
Accepted Manuscript

Figure 1. Herrera et. al., 2019

A



B



C

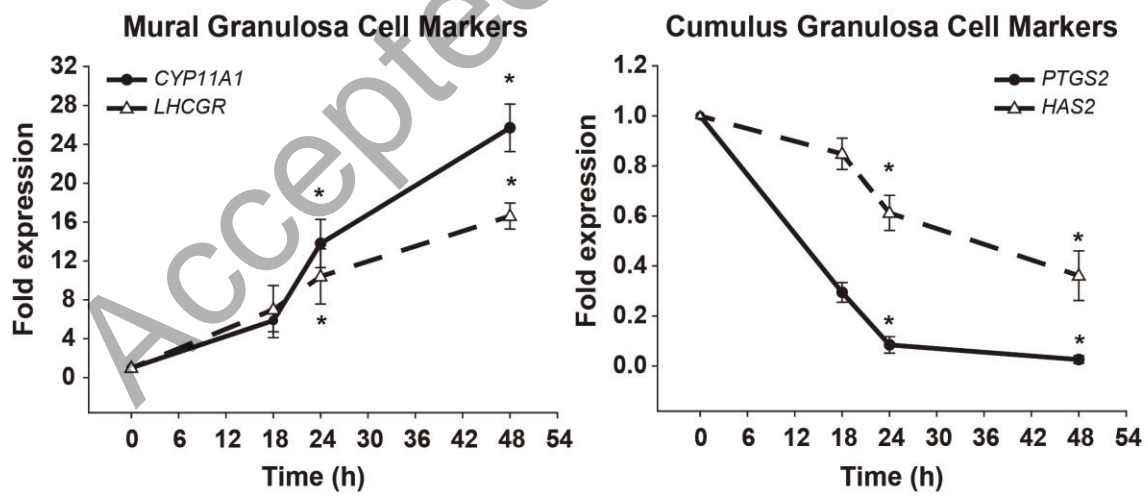
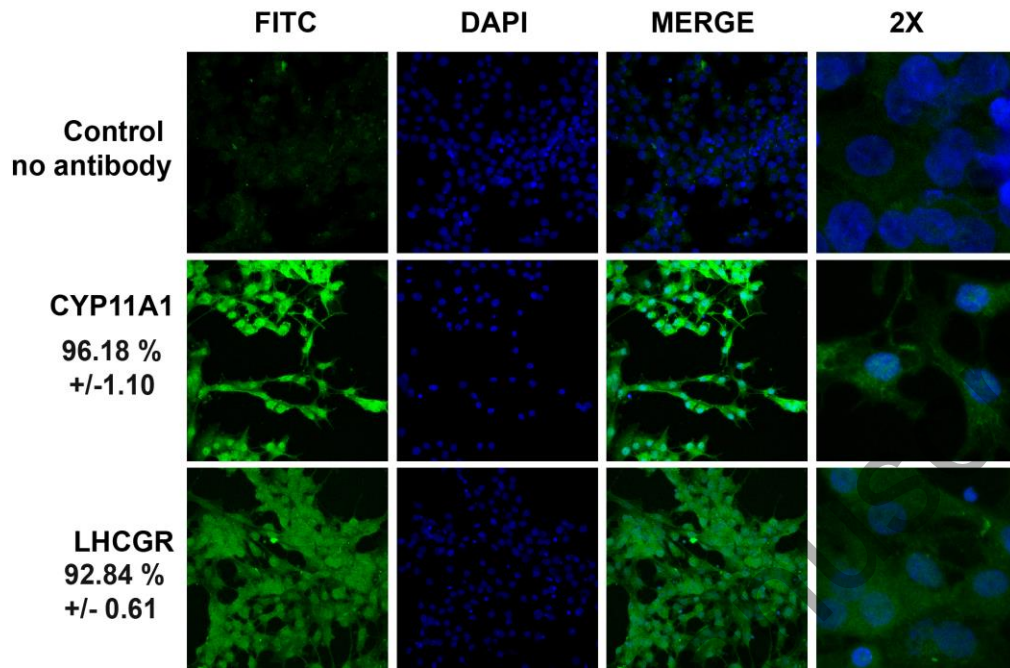


Figure 2. Herrera et. al., 2019



Accepted Manuscript

Figure 3. Herrera et. al., 2019

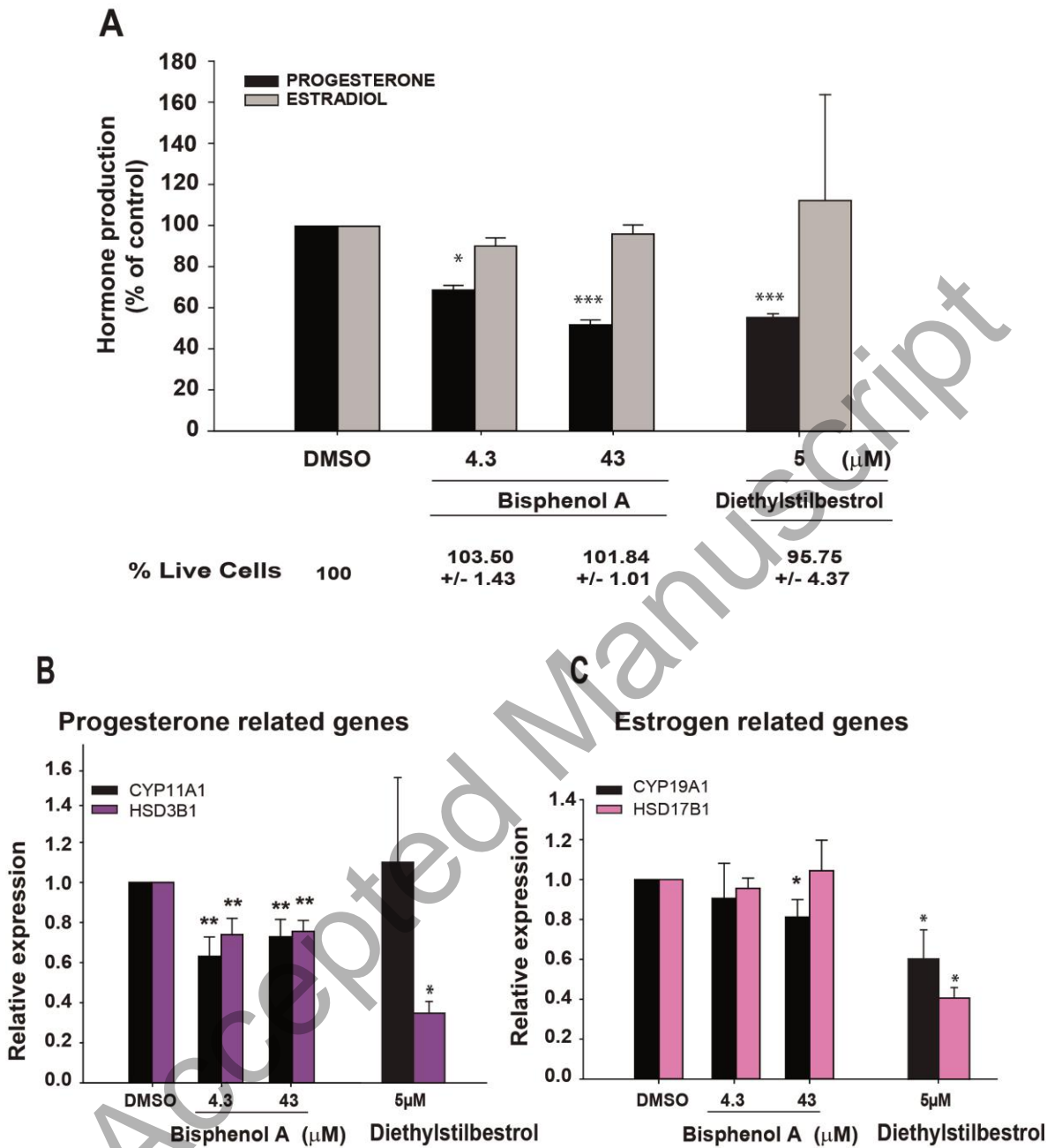


Figure 4 Herrera et. al., 2019

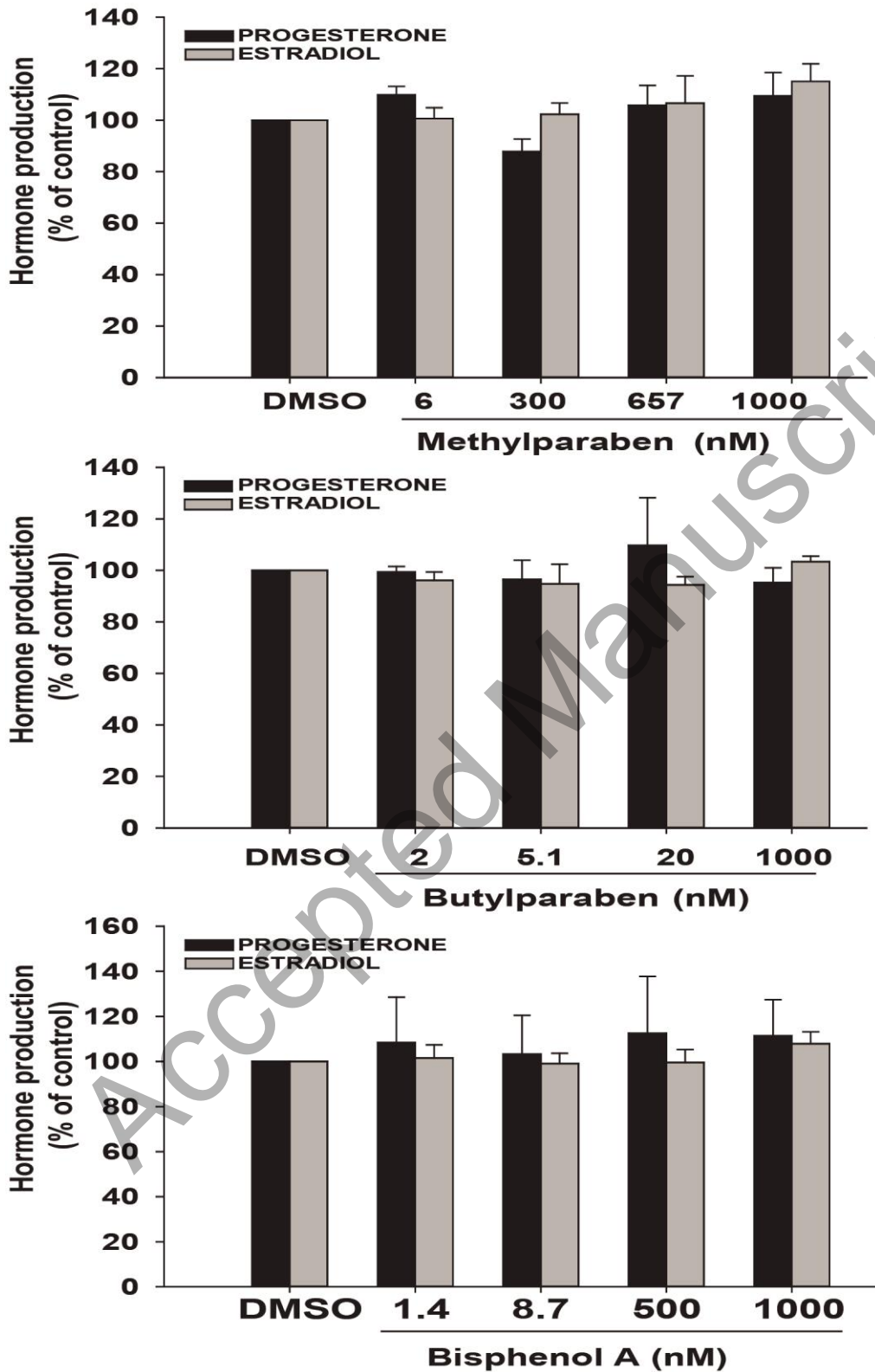


Figure 5 Herrera et. al., 2019

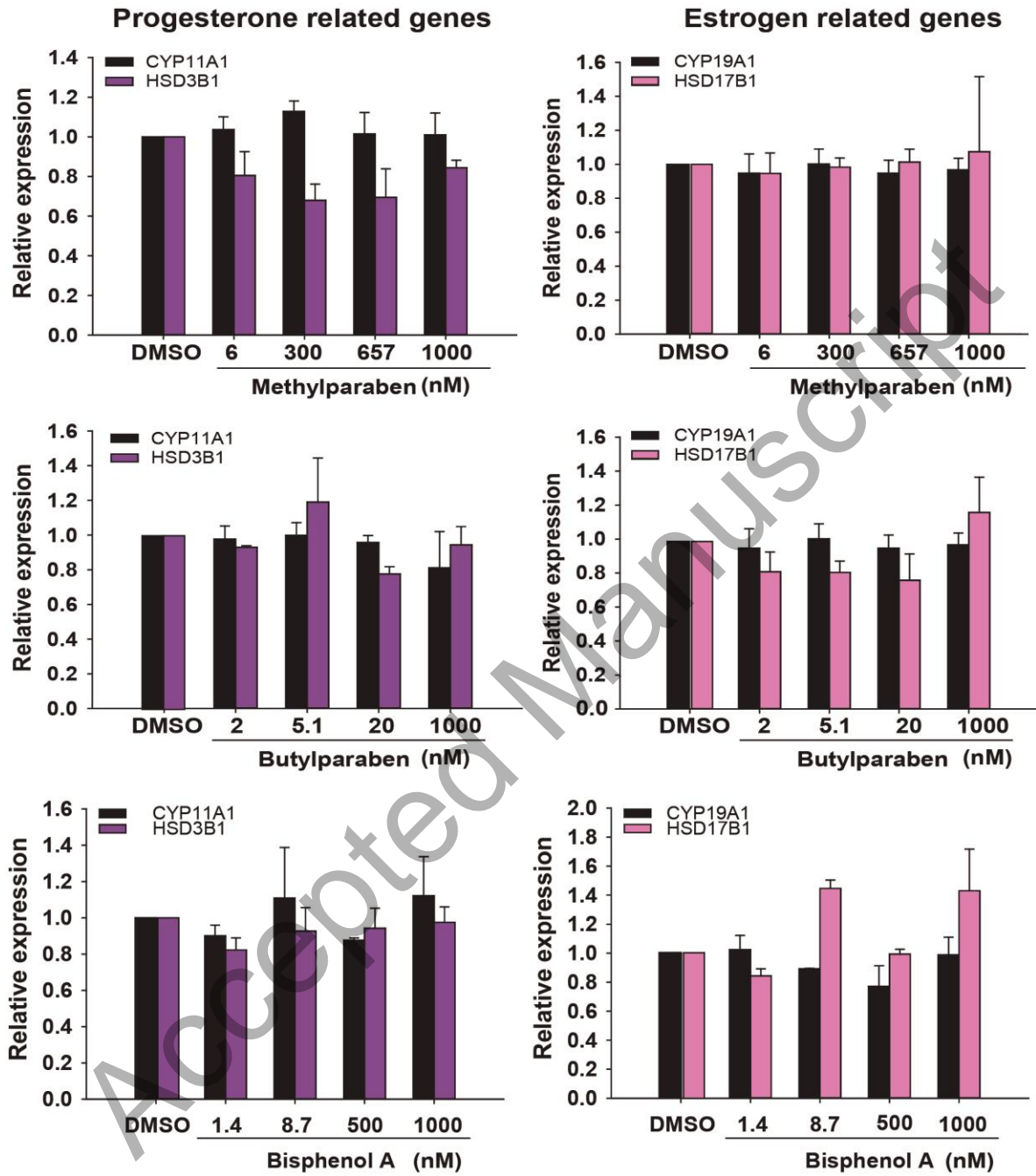
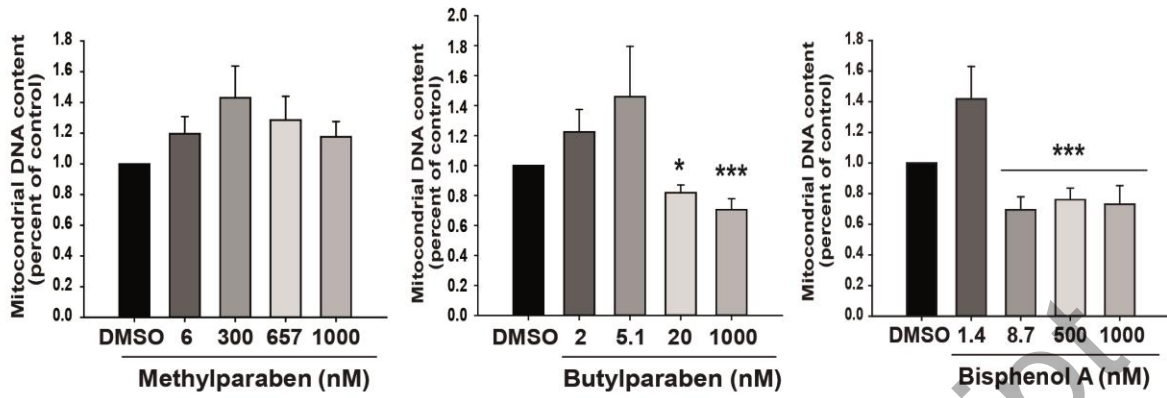
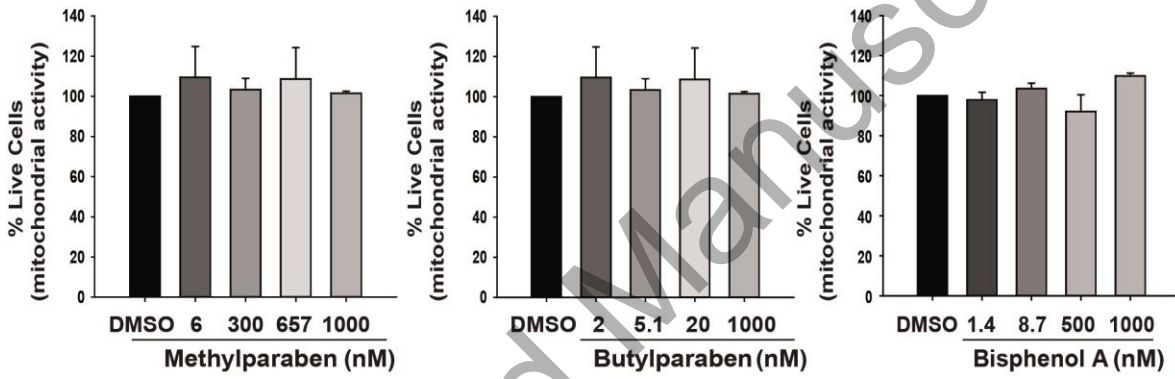


Figure 6. Herrera et. al., 2019

A



B



C

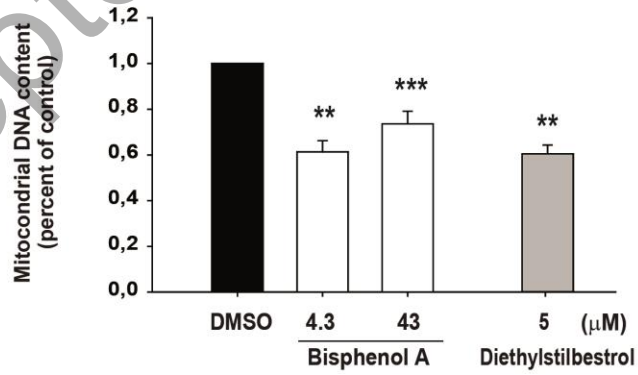


Figure 7. Herrera et. al., 2019

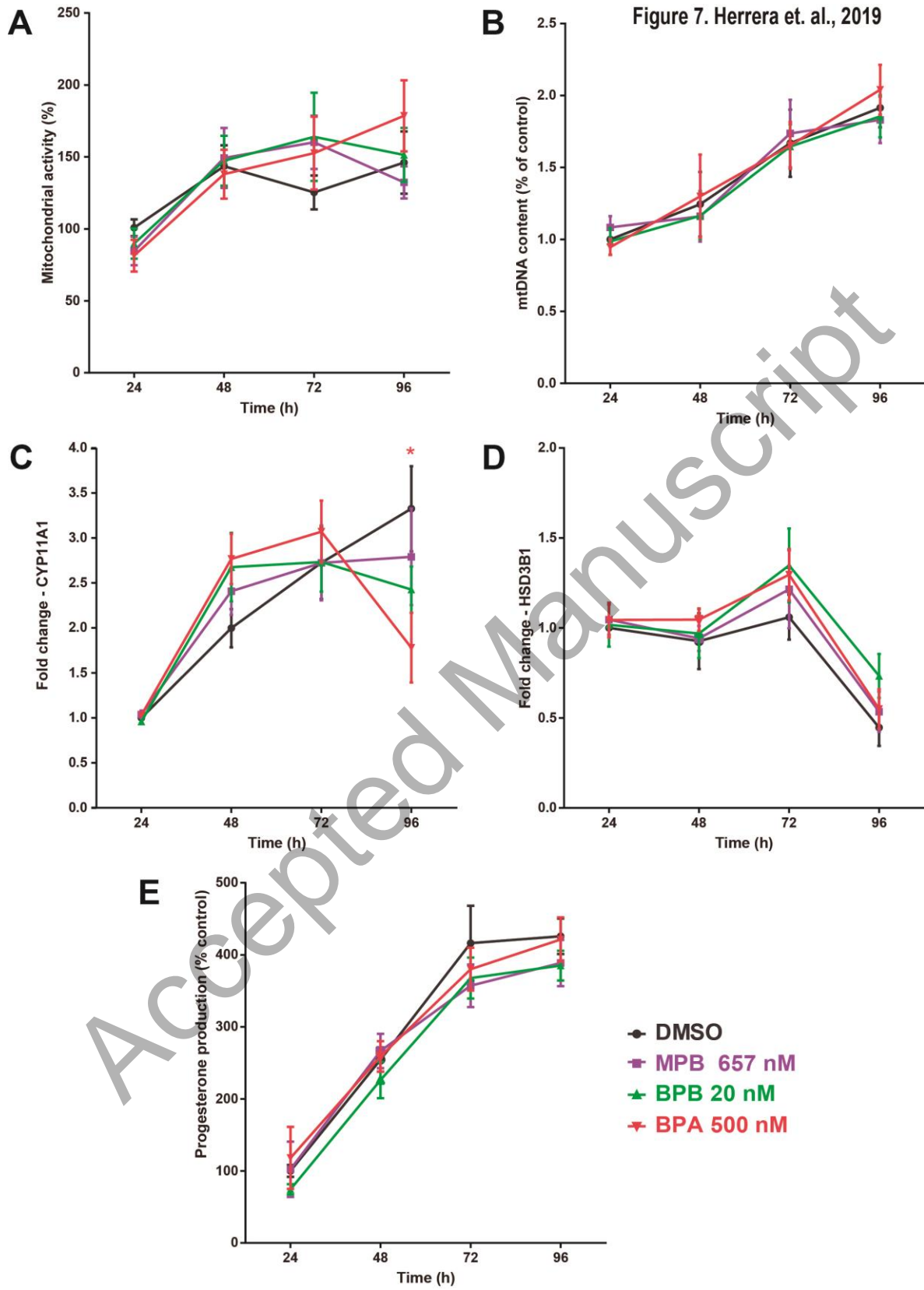


Table 1. Parabens and BPA concentrations found in environmentally exposed women.

Substance	Fluid	Reported concentrations ^a	Selected concentrations ^b	Reference
Methylparaben	Serum Menstrual blood	6 nM 9.2 nM 18.4 nM 61.7 nM 300 nM	6 nM 300 nM (657 nM) (1000 nM)	(Jimenez-Diaz et al., 2016; Sandanger et al., 2011; Vela-Soria et al., 2013)
Butylparaben	Menstrual blood	2 nM 5.1 nM	2 nM 5.1 nM (20 nM) (1000 nM)	(Darbre and Harvey, 2008; Sandanger et al., 2011)
Bisphenol A	Serum Follicular fluid	1.4 nM 2.8 nM 4.4 nM 4.6 nM 7 nM 8.7 nM	1.4 nM 8.7 nM (500 nM) (1000 nM) [4.3 μM] [43 μM]	(Vandenberg et al., 2007)

^a Paraben concentrations used in previous studies.

^b Selected concentrations for this study. Arbitrarily high concentrations (supraphysiological) are in parenthesis and are higher than those found in human fluids but used for *in vitro* or animal treatment in the literature. In brackets are shown concentrations previously reported to induce an estrogenic effect.