



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00083

Matrícula: 2183806575

Efecto del metil-parabeno durante la maduración in vitro de ovocitos de cerdo

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 19 del mes de noviembre del año 2020 POR VIA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

- DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
- DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA
- DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO
- DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: LESLY ADYENI BARAJAS SALINAS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

VOCAL

DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO

SECRETARIO

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

El presente documento cuenta con la firma -auténtica, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

“EFECTO DEL METIL-PARABENO DURANTE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS DE CERDO”

T E S I S

**Para obtener el grado de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal**

PRESENTA

Biól. Lesly Adyeni Barajas Salinas

CO-DIRECTORES

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Dr. Eduardo Casas Hernández

ASESOR

Dr. José Miguel Betancourt Rule



MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES

DIRECTORES:

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Profesora Asociada “D” Tiempo completo
Laboratorio de Neuropsicoendocrinología
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: fahiel@xanum.uam.mx

Dr. Eduardo Casas Hernández

Profesor Titular “C” Tiempo completo
Laboratorio de Biología Celular
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: dino@xanum.uam.mx

ASESOR:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular “C” Tiempo completo
Laboratorio de Biología Celular
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Correo: bet@xanum.uam.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular "C" Tiempo completo

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: bet@xanum.uam.mx

Dr. Edmundo Bonilla Gonzalez

Profesor Titular "C" Tiempo completo

Laboratorio de expresión génica

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: mundo@xanum.uam.mx

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Profesor Titular "C" Tiempo completo

Unidad de Investigación Genética y Toxicología Ambiental

Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, UNAM

Correo: maal@unam.mx

Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Profesor Titular "C" Tiempo Completo

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: deme@xanum.uam.mx

Este trabajo se realizó en el **Laboratorio de Biología Celular R-009** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa .

Este estudio contó con el apoyo de **CONACyT** para estudios de posgrado. **Número de apoyo:** 728437, otorgado por el CONACyT a Lesly Adyeni Barajas Salinas con **CVU:** 932048

El programa de la **Maestría en Biología de la Reproducción Animal** de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el **Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC)** Registro 003797.

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Efecto del metil-parabeno durante la maduración *in vitro* de ovocitos de cerdo**” el día 19 de noviembre del 2020.

PRESIDENTE

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular “C” Tiempo completo

Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: bet@xanum.uam.mx

SECRETARIO

Dr. Edmundo Bonilla Gonzalez

Profesor Titular “C” Tiempo completo

Laboratorio de expresión génica

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: mundo@xanum.uam.mx

VOCAL

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Profesor Titular “C” Tiempo completo

Unidad de Investigación Genética y Toxicología Ambiental

Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, UNAM

Correo: maal@unam.mx

VOCAL

Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Profesor Titular “C” Tiempo Completo

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo: deme@xanum.uam.mx

DEDICATORIA

A mi madre: **Zita Salinas Hernández**, por brindarme su apoyo incondicional durante toda mi vida, por darme sus sabios consejos y forjarme como la persona que soy al día de hoy. TE AMO, MAMÁ.

A mi esposo: **Iván Uriel Bahena Ocampo**, al cual agradezco infinitamente por ser mi compañero de desvelos, alegrías y tristezas, por darme su apoyo incondicional y por ser mi ejemplo a seguir. TE AMO INFINITAMENTE, BOLITO.

A la creadora de este trabajo: **Dra. Yvonne Ducolomb Ramírez**, gracias por creer en mi, por todo su apoyo y su cariño, que aunque no pudo culminar en este mundo material, siempre estuvo presente en mi durante todas las fases de mis estudios de maestría. Abrazo hasta el cielo.

A mis niñas: **Chula, Nina y Pixie**, porque son una luz en mi vida y nada sería igual sin ellas.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos**, gracias por adoptarme cuando partió la Dra. Yvonne, por su apoyo, sus consejos y su sabiduría en el laboratorio y en lo personal, por ser un ejemplo para seguir en mi vida profesional.

Al **Dr. José Miguel Betancourt Rule**, por brindarme su apoyo incondicional, por no regañarme cuando “metía la pata” durante mis experimentos, por toda su sabiduría y sus consejos, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en su laboratorio.

Al **Dr. Eduardo Casas Hernández**, por brindarme todos sus consejos y su sabiduría, por brindarme unas excelentes clases y por la pasión que le pone a la ciencia y que siempre contagia.

Al **Dr. Edmundo Bonilla**, por sus consejos y sus chistes.

Al **Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo**, por sus consejos y su apoyo en el laboratorio, por ayudarme a abrir mis horizontes profesionales.

A **MVZ. Trinidad Sierra Guzmán**, por brindarme su apoyo y paciencia durante las colectas, por sus pláticas amenas y por realizar el trabajo pesado en la colecta de ovarios.

Al **rastro “Los Arcos”**, por brindarme las muestras biológicas para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de maestría, por hacer amenas las clases, por todas las aventuras que vivimos juntos y por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a **Elivier Núñez**, por ser mi equipo de trabajo y quién hizo amenas las largas jornadas de laboratorio.

Al **CONACyT**, por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar mis estudios de maestría con una dedicación exclusiva.

A mi alma mater, la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa**, por brindarme todas las herramientas para lograr mis estudios de posgrado.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Importancia de la reproducción en mamíferos.....	1
1.1.1 Gametogénesis.....	2
1.1.2 Ovogénesis y foliculogénesis.....	2
1.1.3 Maduración del ovocito.....	5
1.2 Toxicología reproductiva.....	6
1.2.1 Agentes xenobióticos.....	6
1.2.2 Parabenos.....	7
1.2.3 Metil-parabeno (MePB).....	9
1.3 Importancia del modelo porcino.....	10
2. Antecedentes	12
2.1 Parabenos y la reproducción.....	13
2.1.1 Parabenos en la maduración del ovocito.....	14
3. Justificación	15
4. Pregunta de investigación	16
5. Hipótesis	16
6. Objetivo general	16
6.1 Objetivos particulares.....	16
7. Diseño experimental	17
8. Metodología	18
8.1 Tratamiento con MePB.....	18
8.2 Maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	18
8.3 Evaluación de la viabilidad y MIV.....	19
8.4 Análisis estadístico.....	21

9. Resultados	22
9.1 Viabilidad.....	22
9.2 MIV.....	23
9.3 Determinación de la concentración letal 50 (CL ₅₀).....	25
9.4 Determinación de la concentración de la inhibición de la maduración 50 (CIM ₅₀).....	25
10. Discusión	25
10.1 Alteraciones citoplasmáticas y de la expansión de las células del cúmulo (CC).....	26
10.2 Viabilidad, MIV, CL ₅₀ y CIM ₅₀	29
11. Conclusiones	31
12. Perspectivas	31
13. Referencias	33
14. Anexos	36
14.1 Preparación de medios de cultivo.....	36
14.2 Preparación de hormonas.....	38
14.3 Dilución de MePB.....	39
14.4 Tinciones.....	40
14.5 Artículo.....	42

RESUMEN

Introducción: Los parabenos (PBs) son compuestos ampliamente utilizados como antimicrobianos y fungicidas en alimentos y productos del cuidado personal. Su uso indiscriminado ha permitido que sean detectados en diferentes ecosistemas, por lo que tanto humanos como otros organismos se encuentran altamente expuestos. El metilparabeno (MePB), comparado con otros PBs, es el más abundante en alimentos, productos de cuidado personal y productos para el cuidado de bebés. El uso de los PBs podría estar ligado a desórdenes hormonales y provocar problemas de fertilidad, ya que recientemente han sido catalogados como disruptores endocrinos (DEs). El conocimiento de los efectos que el MePB puede ocasionar es de gran importancia, ya que se conoce poco en cuanto a sus efectos reproductivos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del MePB en concentraciones de 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM de la MIV en la viabilidad y la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos porcinos, así como determinar la concentración letal 50 (CL_{50}) y la concentración de la inhibición de la maduración 50 (CIM_{50}).

Resultados: Después de la MIV, se observó una dispersión de las células del cúmulo así como alteraciones citoplasmáticas en los ovocitos expuestos a las diferentes concentraciones de MePB; sin embargo, la viabilidad no se vio afectada en las concentraciones evaluadas. Además, la maduración de los ovocitos disminuyó de forma concentración-dependiente después de su exposición al MePB. La CL_{50} estimada fue de 2028.38 μM , mientras que la CIM_{50} fue 780.31 μM .

Conclusión: Hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que demuestra el efecto del MePB sobre la maduración de los ovocitos porcinos *in vitro*. Los resultados demuestran que el MePB alteró la morfología de los ovocitos, afectando la expansión de las células del cúmulo y disminuyendo su maduración, por lo que la exposición al MePB podría ser una de las causas de infertilidad en los mamíferos, incluido el humano.

ABSTRACT

Background: Parabens (PBs) are compounds widely used in food and personal care products industry as antimicrobials and preservatives. Their indiscriminate use has allowed them to be detected in different ecosystems so that humans and other organisms are highly exposed. Methylparaben (MePB), compared with other PBs, is mostly detected in food, personal, and baby care products. PBs could be linked to hormonal disorders generation and fertility impairment since they have been recently classified as endocrine disruptors. The knowledge of the effects that MePB can exert is of great importance since, in terms of reproduction, information is limited. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of MePB on concentrations of 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM porcine oocyte viability and *in vitro* maturation (IVM), as well as to determine the lethal concentration 50 (LC_{50}) and maturation inhibition concentration 50 (MIC_{50}).

Results: After IVM, dispersed cumulus cells and cytoplasmic alterations were observed in oocytes exposed to MePB; however, viability was not affected in the concentration range assayed. In addition, oocyte maturation decreased in a concentration-dependent manner after exposure to MePB. The estimated LC_{50} was 2028.38 μM , whereas MIC_{50} was 780.31 μM .

Conclusions: As far as we know, this is the first study demonstrating that MePB can cause deleterious effects to the *in vitro* maturation of porcine oocytes. This study demonstrates that MePB altered porcine oocytes morphology and caused cumulus cells dispersion, which resulted in decreased oocyte maturation. Therefore, MePB exposure may be one of the factors involved in fertility impairment in mammals, including the human.

ABREVIATURAS

CC= Células del cúmulo

CIM₅₀= Concentración de la inhibición de la maduración 50

CL₅₀= Concentración letal 50

COCs= Complejos ovocito-células del cúmulo

DE= Desarrollo embrionario

DEs= Disruptores endocrinos

DS= Desviación estándar

EROs= Especies reactivas de oxígeno

FSH= Hormona estimulante de los folículos

LH= Hormona luteinizante

MePB= Metil-parabeno

MI= Metafase I

MII= Metafase II

MIV= Maduración *in vitro*

MTT= Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

PBs= Parabenos

PVA= Polivinil alcohol

VG= Vesícula germinal

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la reproducción en los mamíferos.

La reproducción es una característica esencial de los seres vivos, que a lo largo del tiempo les ha permitido perpetuar las características de sus progenitores, las cuales les brindan la capacidad de adaptarse y responder a los cambios ambientales mientras la Tierra misma va cambiando a lo largo del tiempo (Hickman, *et al.*, 2000). En los mamíferos, la reproducción se caracteriza por ser sexual y estacional para algunas especies, por lo que el cortejo y la cópula se producen durante una época de reproducción anual; sin embargo, para otras especies como la humana y la porcina (cerdo doméstico), la reproducción se extiende a lo largo de todo el año (Hickman, *et al.*, 2000).

Para la reproducción sexual, se necesita de la participación de dos progenitores, masculino y femenino, cada uno de los cuales contribuye aportando células sexuales especializadas producidas durante la gametogénesis, conocidas como gametos. Cada gameto aportará la mitad de la información genética que conformará al nuevo individuo y que, al unirse durante la fecundación, definida como la unión de un único espermatozoide a un ovocito (Kardong, 2007), desarrollarán a un nuevo individuo. Así, el inicio de una nueva vida comienza por la formación de un cigoto genéticamente único, diferente de sus padres, y que posee características de su especie, por lo que la variabilidad de las especies es la clave para la reproducción sexual (Hickman, *et al.*, 2000).

1.1.1 Gametogénesis

La gametogénesis, consiste en una serie de transformaciones que ocurren para la formación de los gametos maduros (Hickman, *et al.*, 2000); en los mamíferos presenta características particulares según la especie y se produce por una combinación de divisiones mitóticas, donde se mantiene el número cromosómico diploide característico de la especie (38 para la especie porcina, 46 para la especie humana) y cuya finalidad es la proliferación celular; además, presenta divisiones meióticas que disminuyen a la mitad su número cromosómico, dando como resultado gametos con un número cromosómico haploide (Wassarman, 1989; Albertini, 1994).

La gametogénesis se divide típicamente en cuatro fases: 1) el origen extraembrionario de las células germinales y su migración a las gónadas, 2) el aumento del número de las células germinales mediante mitosis, 3) la reducción del número cromosómico mediante meiosis y 4) la maduración estructural y funcional de los ovocitos y los espermatozoides. Durante la primera fase de la gametogénesis el proceso es idéntico en hembras y machos; sin embargo, las últimas tres fases se diferencian entre los patrones específicos de género: ovogénesis y foliculogénesis para las hembras y espermatogénesis y espermiogénesis para los machos (Carlson, 2019).

1.1.2 Ovogénesis y foliculogénesis

La ovogénesis y la foliculogénesis son dos procesos que ocurren simultáneamente dentro del folículo ovárico, y que son esenciales para la producción de un ovocito maduro. Por un lado, la ovogénesis involucra la formación y la maduración del ovocito, y por el otro, la foliculogénesis es una serie de procesos que conducen al crecimiento del folículo, así como la proliferación de las células de la teca y de las células que acompañan al ovocito, denominadas células de la granulosa, las cuales mantienen una comunicación íntima con éste (Sadler & Langman, 2012).

Estos procesos de diferenciación se inician en la etapa embrionaria con la migración de las células germinales primordiales a partir del saco vitelino, formado del intestino posterior del embrión, hacia las crestas genitales, para formar los ovarios en donde se diferencian a ovogonias (Bielanska-Osuchowska, 2006). Los folículos primordiales de los ovarios de los mamíferos están constituidos por un ovocito detenido en la profase de la primera división meiótica y una capa aplanada de células foliculares, donde señales citoplasmáticas son emitidas hacia el ovocito, por medio de uniones comunicantes (Betancourt, *et al.*, 2003).

Las ovogonias son diploides ($2n, 4c$), donde n es el número de cromosomas y c la cantidad de ADN contenido y se dividen por mitosis durante el primer tercio del desarrollo, disponiéndose en grupos rodeados por una capa de células epiteliales planas conocidas como células foliculares, originándose a partir del epitelio celómico que recubre el ovario (Sadler & Langman, 2012). Posteriormente, las ovogonias se diferencian en ovocitos primarios en los que se inicia la primera división meiótica (Betancourt, *et al.*, 2003). En esta primera división el ovocito queda detenido en la etapa de diploteno de la profase de la primera división meiótica (Betancourt, *et al.*, 2003). Los ovocitos primarios se encuentran rodeados por una capa de células foliculares planas, que en conjunto se conocen como folículo primordial. Mientras el ovocito primario lleva a cabo su crecimiento, se forma una capa de glucoproteína, llamada zona pelúcida; las células foliculares planas del folículo primordial, pasan a ser cuboides formando a las células de la granulosa y conformando al folículo primario (Leung & Adash, 2004), posteriormente, las células de la granulosa cuboides proliferan para generar un epitelio estratificado de células de la granulosa y células de la teca, esta etapa se denomina folículo secundario (Figura 1) (Sadler & Langman, 2012; Young & McNeilly, 2010).

Al nacimiento de la mujer, todos los ovocitos han iniciado la profase de la meiosis I, pero en lugar de continuar hacia la metafase, se detienen en la fase de diploteno manteniéndose arrestados hasta después de la pubertad. Hasta este momento existe un número total de entre 600 000 y 800 000 ovocitos, que durante la infancia la mayoría

se vuelven atrésicos, llegando a la pubertad solo unos 40 000, de los cuales sólo se ovularán entre 400 y 500, uno por mes hasta el final de la fertilidad (Sadler & Langman, 2012).

Durante la pubertad, los estímulos de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) llevan a que el ovocito concluya la primera división meiótica y la formación del primer cuerpo polar (Betancourt, *et al.*, 2003). A su vez, una oleada folicular de entre 15 a 20 folículos llevan a cabo su maduración, pero sólo algunos acumulan líquido, conocido como fluido folicular, formando el antro y dando paso a la formación del folículo antral (Figura 1) (Sadler & Langman, 2012; Young & McNeilly, 2010). En esta etapa se diferencian las células de la teca interna y externa, separadas por una membrana de las células de la granulosa, donde el folículo continúa su crecimiento acumulando cada vez más fluido folicular hasta formar los folículos de Graff (Sadler & Langman, 2012) y posteriormente el cuerpo lúteo (Young & McNeilly, 2010). A su vez, el ovocito continúa la segunda división, y quedando detenido en la metafase II (MII), con una carga genética haploide $1n, 2c$, etapa en la cual ocurre la ovulación en la mayor parte de los mamíferos. Si ocurre la fecundación, se concluye la segunda división meiótica, se separan las cromátidas hermanas y se produce la expulsión del segundo cuerpo polar y el ovocito llega al estado haploide $1n, 1c$ (Betancourt, *et al.*, 2003).

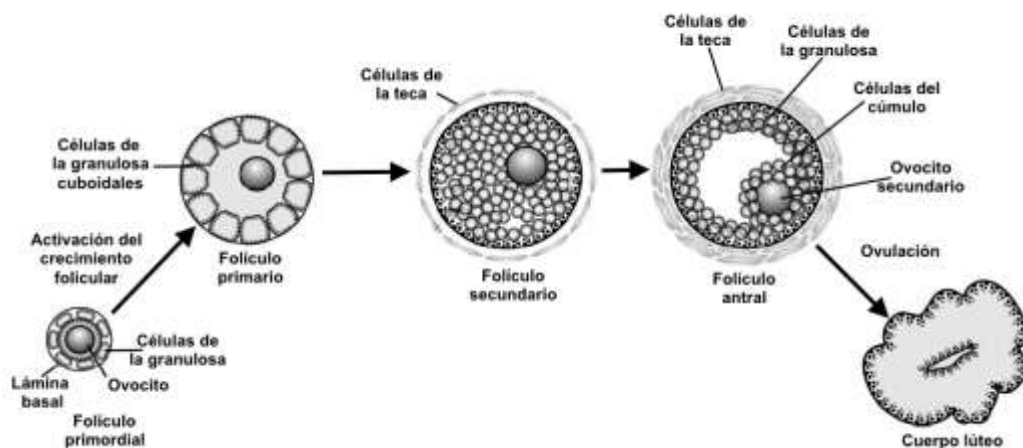


Figura 1. Ilustración de los procesos de foliculogénesis. Modificado de Young & McNeilly, 2010.

1.1.3 Maduración del ovocito

La maduración es la última etapa por la que debe pasar el ovocito para adquirir la capacidad de ser fecundado y dar origen a un nuevo individuo; involucra una serie de cambios bioquímicos y morfológicos en el ovocito que lo preparan para llevar a cabo la fertilización y el desarrollo embrionario (DE) (Flores, 2017). La maduración del ovocito consta de dos procesos: la maduración meiótica o nuclear y la citoplasmática. Se conoce como maduración meiótica al avance del ovocito desde el estado de diploteno de la primera profase hasta la metafase de la segunda división meiótica. El reinicio de la meiosis se presenta después del pico preovulatorio de la LH, esta etapa se caracteriza por el rompimiento de la vesícula germinal (Ducolomb, *et al.*, 2012) y la expulsión del primer cuerpo polar (Betancourt, *et al.*, 2003).

La maduración citoplasmática, es un proceso muy complejo que implica una serie de acontecimientos no relacionados directamente con el progreso de la meiosis, pero que preparan al ovocito para la fertilización y DE (Teteltitla, 2014). En este proceso se produce una redistribución de las mitocondrias a una posición perinuclear, que es necesaria para el progreso de la maduración (De los Reyes, 2011). Los gránulos corticales, que están constituidos principalmente por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas, se forman en el retículo endoplásmico y complejo de Golgi migrando hacia la periferia del ovocito, aumentan en número y se sitúan debajo de la membrana plasmática en forma de monocapa; después de la fertilización, la exocitosis de las enzimas hidrolíticas de estos gránulos evita la entrada de espermatozoides adicionales constituyendo un bloqueo para la polispermia (Yanagimachi, 1994).

Por otro lado, la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), la fertilización *in vitro* (FIV) y el DE *in vitro* son técnicas de reproducción asistida útiles para detectar posibles efectos de agentes tóxicos, que pueden repercutir en procesos reproductivos en el humano (Santos, *et al.*, 2014). En toxicología reproductiva los modelos *in vitro* permiten sugerir el efecto potencial de determinadas sustancias como los xenobióticos. El porcino es

un modelo experimental adecuado debido a que su fisiología, anatomía, bioquímica y sistema endócrino es similar al humano (Campagna, *et al.*, 2002).

1.2 Toxicología reproductiva

La palabra toxicología tiene una raíz etimológica que deriva de dos palabras griegas: *toxikon* (veneno) y *logos* (estudio o tratado), por lo tanto, se refiere a la “ciencia de los venenos”, que involucra diversos factores como la descripción, comprensión y posible efecto de los compuestos tóxicos sobre los seres vivos. La toxicología reproductiva se define como la rama de la toxicología que estudia los efectos deletéreos producidos por agentes ajenos al organismo, llamados xenobióticos, en la reproducción (Flores, 2017) repercutiendo en la fertilidad de los organismos, definida como la capacidad de una hembra para producir ovocitos que puedan ser fecundados, o la de un macho para producir espermatozoides en un número y calidad suficientes como para realizar dicho proceso (Kardong, 2007). En los últimos años en humanos, la infertilidad se ha incrementado y parte de esto es debido a la exposición de xenobióticos, la cual comienza *in útero*, en algunos casos, y puede persistir a través de los años (Giulivo, *et al.*, 2016).

1.2.1 Agentes xenobióticos

Los agentes xenobióticos son sustancias de naturaleza química ajena al organismo, que producen efectos tóxicos o alteran el funcionamiento normal de los organismos. Estos compuestos pueden ser agentes químicos naturales o sintéticos, biológicos y físicos (Bonilla, *et al.*, 2001). Existe una exposición constante de los organismos a compuestos químicos ambientales como metales pesados, sustancias orgánicas como plaguicidas y sustancias químicas que forman parte de materiales de uso diario como los compuestos perfluorados, bifenilos policlorados, antimicrobianos y ésteres de ácido p-hidroxybenzoico, como los parabenos (PBs), cuya presencia ha sido reportada en

poblaciones de todo el mundo (Asimakopoulos, *et al.*, 2015). En la actualidad, en el laboratorio de biología celular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, se llevan a cabo estudios sobre xenobióticos que pueden afectar la fertilidad de ciertos organismos, siendo éste el primer trabajo evaluando el efecto del metil-parabeno (MePB).

1.2.2 Parabenos

Los PBs son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico (Figura 2. A), con un sustituyente alquílico, que dependiendo del largo de la cadena, pueden ser MePB, etil (EtBP), propil (PrPB) y butil (BuPB) parabenos (Figura 2. B) (Błędzka, *et al.*, 2014), de los cuales el MePB y el PrPB son los de uso más frecuente y usualmente de forma conjunta (Núñez, *et al.*, 2008).

Debido a sus características inertes, son útiles como agentes antimicrobianos y fungicidas (Dodge, *et al.*, 2015); se utilizan como conservadores en pastas dentales, productos capilares, desodorantes, cremas y lociones, (Guo y Kannan, 2013). Además, por ser empleados en envases y aditivos de alimentos, papel moneda, folletos y periódicos, también se pueden encontrar en alimentos como carne, pescados, mariscos, lácteos, cereales, frutas y vegetales, agregados de forma sintética como conservadores, pero también producidos de forma natural en vinos y arándanos (Liao, *et al.*, 2013; Liao y Kannan, 2014; Giulivo, *et al.*, 2016). En los productos farmacéuticos son utilizados como excipientes y agentes para evitar la contaminación microbiana e impedir la degradación de los principios activos. Las fuentes de ingreso al organismo pueden ser por diferentes vías como ingestión, inhalación y absorción dérmica, aunque esta última puede ser la ruta más importante de exposición a los PBs, debido a su uso generalizado en productos de cuidado personal; la ingestión puede ser otra ruta importante (Dodge, *et al.*, 2015).

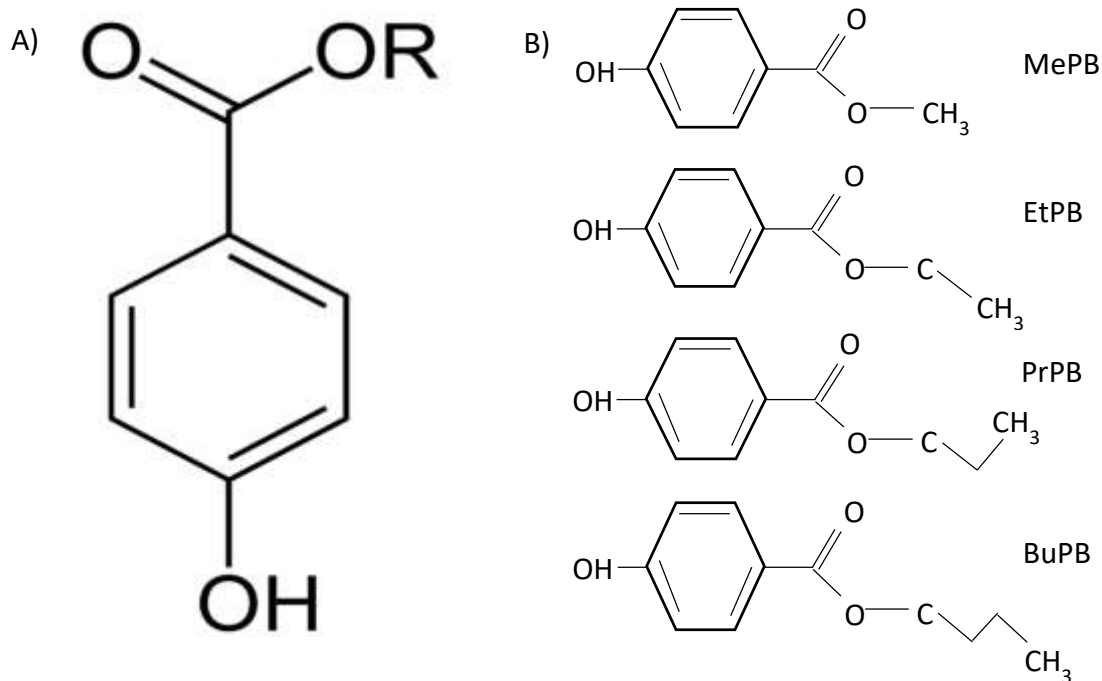


Figura 2. A) Estructura general de los ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, donde R = MePB, EtPB, PrPB, BuPB, entre otros. B) Estructura del MePB, EtPB, PrPB, BuPB.

Los PBs se utilizaron por primera vez en el siglo XX como conservadores de productos farmacéuticos y, desde entonces, han sido ampliamente utilizados tanto en cosméticos como en productos farmacéuticos; se pueden encontrar en productos de cuidado personal de uso diario como cremas de protección solar, preservativos, fragancias, desinfectantes, repelentes de insectos, productos alimenticios y en varios productos industriales (González-Doncel, *et al.*, 2013). Una de las características de los PBs es que son estables químicamente a un pH entre 7.4-7.5, son solubles en agua, relativamente inocuos (no-irritantes y no-sensibilizantes), tienen bajo costo de producción, son inertes y no cambian la consistencia ni la coloración de los productos, además, tienen bajo grado de toxicidad sistémica (Soni, *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha sugerido que los PBs poseen actividad carcinogénica (Darbre, *et al.*, 2014) y estrogénica (Oishi, 2001).

Los PBs son catalogados como contaminantes orgánicos emergentes, y pueden alterar el equilibrio normal de los sistemas endocrinos, por lo que a este grupo de productos se les denomina disruptores endocrinos (DEs) (Costa, *et al.*, 2014). Los DEs son sustancias exógenas que alteran la función del sistema endocrino, causando efectos adversos en la salud de los organismos o su progenie (Giulivo, *et al.*, 2016). Estos compuestos interfieren potencialmente con la producción, secreción, metabolismo, transporte o acción periférica de hormonas endógenas por medio de su unión a receptores hormonales. Después de unirse a los receptores, los DEs pueden desencadenar dos tipos de respuesta: imitar la acción hormonal, que se denomina efecto agonístico, o provocar una falta de respuesta y evitar la unión de la hormona, lo que se denomina efecto antagónico (Costa, *et al.*, 2014).

1.2.3 Metil-parabeno (MePB)

El MePB es un compuesto derivado del ácido 4-hidroxibenzoico, que posee un carbón en la posición éster, siendo su fórmula química $C_8H_8O_3$ (Figura 2, B); tiene un peso molecular de 152.15 y un pK_a 8.17; su punto de fusión es de 131 °C y su punto de ebullición es de 270-280°C (Soni, *et al.*, 2005). Se sabe que mientras la cadena de carbonos aumenta, su actividad antimicrobiana aumenta y su solubilidad disminuye (Elder, 1984), por lo que el MePB es el más soluble en agua. Se sabe también que la replicación microbiana ocurre en un medio acuoso, por lo que el alto grado de disolución del MePB lo hace ser, en conjunto con sus demás características, uno de los PBs más utilizados (Soni, *et al.*, 2005).

Usualmente los PBs terminan como productos de desecho que llegan al medio ambiente y cuerpos de agua por medio de las aguas residuales, siendo éstos los lugares más susceptibles a la contaminación, aunque también pueden quedar como partículas suspendidas en la atmósfera (Bledzka, *et al.*, 2014). Es por esto que diversos organismos quedan expuestos a estos compuestos. Estudios realizados en peces, indicaron la presencia de MePB en el 90% de los tejidos analizados, y PrPB en

el 70% (Ramaswamy, *et al.*, 2011). Además, se reportó que en osos negros, aves y peces, los PBs se acumulan en tejidos como el hígado y riñón, además de plasma y huevos, siendo el MePB el de mayor abundancia, con una alta concentración de hasta 68.6 $\mu\text{g/g}$ de tejido, lo cual muestra que la ingesta de organismos provenientes de sitios contaminados pueden constituir una fuente de exposición a estas sustancias, aunque la principal forma de exposición para el ser humano sea por medio de productos de cuidado personal y farmacéuticos (Xue, *et al.*, 2016).

A nivel reproductivo, se ha asociado al MePB con la disminución de la reserva ovárica en mujeres que se encontraban en tratamientos contra la infertilidad, en una clínica de Boston, Massachusetts EUA (Smith, *et al.*, 2013), y, por otro lado, Nishihama, *et al.*, 2017, asociaron la presencia de PBs en la orina con el acortamiento del ciclo menstrual, en estudiantes universitarias de Japón, donde los PBs mostraron efectos como DEs, alterando así los niveles de estrógenos en sangre y dando como resultado una transición más temprana de la fase folicular a la fase lútea, pudiendo alterar procesos reproductivos durante la ovogénesis y/o el desarrollo folicular, y con ello, la maduración de ovocitos (Nishihama, *et al.*, 2017).

1.3 Importancia del modelo porcino

El uso del cerdo como modelo experimental ha ido en aumento debido a las similitudes fisiológicas, anatómicas y metabólicas con el humano (Bode, *et al.*, 2010), lo cual lo hace un modelo ideal en el que diversos estudios puedan representar el efecto de diversos tóxicos que podrían causar efectos en los seres humanos. En el aspecto reproductivo, las cerdas poseen un ciclo estral de 21 días, donde el primer día se presenta la ovulación; se clasifica de acuerdo a su comportamiento sexual, siendo el estro y proestro las etapas receptivas, y las etapas donde no hay receptividad sexual son el diestro y el metaestro (Senger, 2005). En contraste, el ciclo de la mujer se conoce como ciclo menstrual, con una duración de 28 días, y está caracterizado por la presencia de sangrado, específico en humanos y primates llamado menstruación, que

se presenta en el primer día del ciclo, siendo el día 14 el día que usualmente se presenta la ovulación (Silverthorn, 2007;Senger, 2005). Tanto mujeres como cerdas son ovuladoras espontáneas con ciclos continuos regidos por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Silverthorn, 2007;Senger, 2005), en el cual se estimulan y secretan las hormonas encargadas de producir la ovulación; sin embargo, mientras que el pico de hormona más alto y que desencadena el surgimiento del ovocito maduro hacia la zona de fertilización en mujeres es la hormona luteinizante (LH), en la cerda el pico hormonal más alto y que será el encargado de desencadenar la ovulación, es la producción de estradiol (Lorenzen, *et al.*, 2015). Por otro lado, aunque el útero de la mujer es simple mientras que en la cerda es bicorne, presentando dos tubos uterinos, en ambos casos la fecundación del ovocito ocurre en el oviducto, específicamente en la zona ampular-itsmica (Eurell & Frappier, 2006). Así, la suma de estas características hacen a la especie porcina un modelo ideal para estudiar el efecto y repercusión de diversos tóxicos en la viabilidad y maduración del ovocito.

2. ANTECEDENTES

Los PBs se encuentran en aproximadamente el 80% de los productos de cuidado personal (Pouillot, *et al.*, 2006), y en aproximadamente el 36% de productos para bebés (Eriksson, *et al.*, 2008). Específicamente, el MePB se encuentra en el 48% de los cosméticos y productos de cuidado personal, por lo que la exposición a éste es frecuente (Masten, 2005).

En cuanto a su toxicocinética, un estudio realizado en ratas mostró que en dosis de 100 mg/kg de MePB, PrPB y BuPB, aplicadas por vía oral y subcutánea, se encuentran altamente disponibles a nivel sistémico; mientras que el tiempo máximo de moléculas biodisponibles por administración oral es de 30 minutos a 1 hora, a una concentración máxima de 11,400 a 42,300 ng/mL; en administración dérmica de 100 mg/kg, la concentración máxima a nivel sistémico es mayor para MePB, lo cual sugiere que mientras menor sea la cadena del alquilo, mayor será la absorción (Aubert, *et al.*, 2012). Aunque se ha observado que los PBs son rápidamente metabolizados en el organismo, la exposición a estos compuestos es continua (Calafat, *et al.*, 2010). Las vías de ingreso al organismo pueden ser por ingestión, inhalación y dérmica, aunque existen reportes que afirman que después de 24 horas de administración la mayoría de los PBs son metabolizados y se excretan por la orina (Janjua *et al.*, 2008). Otros estudios muestran que, cuando la exposición a productos de cuidado personal con PBs sobre la piel es frecuente, se acumulan en los tejidos subyacentes (Darbre *et al.*, 2014), además de que el producto final del metabolismo de los PBs, el ácido 4 hidroxibenzoato (4HB), posee efectos estrogénicos (Xue *et al.*, 2016), pudiendo tener una repercusión negativa en procesos reproductivos tan importantes como es la maduración del ovocito.

2.1 Parabenos y la reproducción

En cuanto a los PBs y el sistema reproductor, existen trabajos que sustentan el efecto adverso que poseen dichos compuestos; por ejemplo, en ratas macho jóvenes a las que se les suministraron PBs por vía oral, se observó una disminución en el tamaño y el peso del epidídimo y de las vesículas seminales, además de una baja producción espermática y descenso en los niveles de testosterona (Oishi, *et al.*, 2001). En otro estudio se encontraron efectos adversos en la producción espermática y bajos niveles de testosterona en ratas machos expuestas oralmente a PBs (Samarasinghe, *et al.*, 2018). También fue reportado que los PBs afectan la supervivencia del embrión de pez (*Oryzias latipes*) en concentraciones mayores a 1000 µg/L, se observaron alteraciones histológicas en el 37.5% de ellos y la morfometría mostró retardo en el DE en concentraciones mayores a 400 µg/L (González-Doncel, *et al.*, 2013).

En estudios donde se evaluaron los efectos de los PBs en el sistema reproductor femenino, Mínguez-Alarcón, *et al.*, (2017), observaron que la fecundidad en las parejas disminuyó un 40% cuando las mujeres presentaban 133 µg/L de MePB, 24 µg/L de PrPB y 1.5 µg/L de BuPB en la orina. Otro estudio indicó una relación entre las concentraciones de los PBs con el acortamiento del ciclo menstrual, lo que podría impactar en la fecundidad (Nishihama, *et al.*, 2017).

En modelos *in vitro*, un estudio reciente realizado en una clínica de reproducción humana, indicó que los PBs, principalmente el MePB, a una concentración 13 mM, equivalente a la presente en lubricantes vaginales, inhibieron la viabilidad y la motilidad espermática de manera concentración-dependiente y que la mezcla de los cuatro principales PBs (MePB, EtPB, PrPB y BuPB) exacerba estos efectos desde concentraciones 1mM (Samarasinghe, *et al.*, 2018).

En células de cáncer de mama se ha demostrado que la exposición a estos compuestos a concentraciones micromolares, pueden estimular su proliferación por vía estrogénica, a través de la inhibición competitiva de los receptores de estrógenos

(Byford, *et al.*, 2002). Por otro lado, en estudios recientes se demostró que el BuPB inhibe la proliferación en más del 50% de células de trofoblasto de embriones humanos, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), induciendo más del 30% de apoptosis, a concentraciones 200 μM (Yang, *et al.*, 2018).

2.1.1 Parabenos en la maduración del ovocito

En ovocitos porcinos, recientemente se han publicado estudios que evalúan el efecto del BuPB durante la MIV. En el trabajo de Meng, *et al.*, (2020), encontraron que a concentraciones a partir de 200 μM de Isobutil-parabeno (IBP), la tasa de expulsión del primer cuerpo polar se vió reducida, y a concentraciones de 400 μM , hay un efecto deletéreo en la expansión de las células del cúmulo, los cuales son parámetros para evaluar la maduración de ovocitos porcinos *in vitro*. Por otro lado, se observaron anomalías en el huso, desarreglos cromosómicos, y una mala distribución de los filamentos de actina, lo cual indica que la arquitectura del ovocito podría ser el lugar de acción del IBP; además, se encontró que las tasas de generación de EROs y los niveles de apoptosis incrementaron significativamente respecto a la exposición del IBP (Meng, *et al.*, 2020). Aunado a esto, recientemente Joeng, *et al.* (2020), comprobaron que el BuPB provoca efectos deletereos en la proliferación de células del trofoblasto de embriones porcinos madurados *in vitro*, a partir de concentraciones 300 μM .

3. JUSTIFICACIÓN

Los PBs son compuestos ampliamente utilizados como antimicrobianos, conservadores de productos de higiene de uso diario, preservadores de alimentos y como excipientes en productos farmacéuticos. Su uso indiscriminado ha provocado que se detecten en diferentes ecosistemas, por lo que, tanto los seres humanos como otros organismos pueden estar expuestos a estos compuestos.

Los estudios del Informe Nacional sobre Exposición Humana a Químicos Ambientales en la población de EUA entre 2005-2006, detectaron que el MePB y el PrPB estuvieron presentes en la mayoría de las personas analizadas (99.1% y 92.7%), respectivamente, mientras que el BtPB en 40% de las muestras (Dodge *et al.*, 2015). Según Aubert, *et al.* (2012), los PBs de cadena corta como el MePB penetran más en los tejidos que los PBs de cadena larga. El MePB es uno de los compuestos más utilizados en las distintas fórmulas de los productos de uso personal, y uno de los más abundantes encontrados en los tejidos animales examinados, es el que se ha encontrado en mayor cantidad con respecto a otros PBs en tejidos como el hígado, riñón, huevo y plasma de diferentes especies (Xue, *et al.*, 2016). Existen pocos reportes sobre el efecto que estos compuestos químicos puedan tener sobre la reproducción y la mayoría de ellos son estudios *in vivo* (Bledzka, *et al.*, 2014), por lo que se requiere estudiar el efecto que estos compuestos puedan tener en diferentes eventos relacionados a la reproducción, como la maduración de los ovocitos, el cual es un proceso fundamental para la fertilización y el DE, por lo que, cualquier alteración en este proceso podría comprometer la fertilidad del individuo.

Algunos estudios indican que los PBs son DEs ya que tienen propiedades estrogénicas, y, además, se ha demostrado que el BuPB produce daños en el ovocito porcino (Meng, *et al.*, 2020; Joung, *et al.*, 2020), por lo cual el MePB podría tener efectos adversos sobre la salud reproductiva.

Los estudios *in vitro* constituyen una herramienta útil para determinar el efecto que los xenobióticos puedan ocasionar sobre eventos aislados de la función reproductiva como la maduración y la fertilización. En toxicología reproductiva, el cerdo es un modelo indicado para la evaluación de la maduración de ovocitos, ya que presenta muchas similitudes anatómicas, fisiológicas y bioquímicas con el ser humano (Flores, 2017). Por lo tanto, es importante evaluar el efecto que los PBs, específicamente el MePB, pueda tener sobre la MIV de porcinos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La exposición de los ovocitos porcinos al MePB disminuirá su maduración *in vitro*?

5. HIPÓTESIS

Los PBs causan alteraciones a nivel reproductivo, por lo tanto, afectarán la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del MePB en la maduración *in vitro* de ovocitos en el modelo porcino.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar el efecto del MePB sobre la viabilidad de los ovocitos porcinos.
- 2.- Evaluar el efecto del MePB en la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos.
- 3.- Determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) y la concentración de inhibición de la maduración 50 (CIM₅₀).

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Evaluación del efecto del MePB sobre la viabilidad y la MIV.

Se hicieron tres grupos aleatorios de al menos 50 complejos ovocito-células del cúmulo (COCs) cada uno para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de MePB: (0 control, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM) y determinar la concentración letal 50 (CL_{50}) y la concentración de inhibición de la maduración 50 (CIM_{50}) (Figura 3).

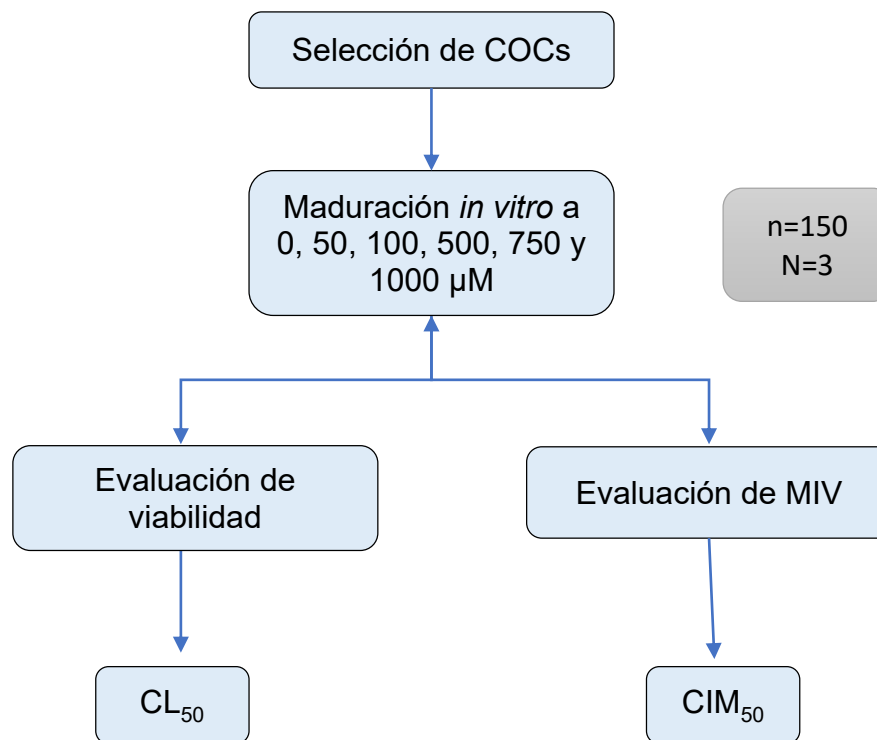


Figura 3. Diseño experimental

8. METODOLOGÍA

8.1 Tratamiento con MePB

Se utilizó MePB de la marca Sigma-Aldrich (Merck):

- Metil-parabeno (MePB): Methyl (4-hydroxybenzoate) PM 152.15 CAS Número: 99-76-3.
- La disolución y dilución del MePB se realizó con medio de maduración *in vitro* (TCM-199, In Vitro México), para obtener la concentración stock de 16.4 mM y a partir de ella se obtuvieron las concentraciones finales de 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μ M.

Se emplearon como base concentraciones de 0, 50, 100 y 500 μ M del MePB, las cuales se encuentran dentro del rango utilizado para determinar el efecto estrogénico en células humanas de cáncer de mama (MCF7) (Byford, *et al.*, 2002). Posteriormente, se incluyeron concentraciones de 750 y 1000 μ M de MePB. La exposición de los ovocitos porcinos a las concentraciones de MePB antes descritas, se agregaron a la caja de cultivo durante las 44 h de MIV.

8.2 Maduración *in vitro*

Los ovarios se colectaron de aproximadamente 225 cerdas prepúberes de aproximadamente 6 meses de edad, sacrificadas en el rastro (Los Arcos, Edo. de México). Los ovarios se transportaron al laboratorio en una solución 0.157 M de NaCl, a una temperatura entre 25-28°C. Al llegar al laboratorio en un lapso no mayor a 2 horas, sólo los folículos ováricos que medían entre 3 y 6 mm se puncionaron para la obtención del fluido folicular que contienen los complejos ovocito-células del cúmulo (COCs), usando para esto una aguja de calibre 18 fijada a una jeringa desechable de 10 mL. El fluido folicular colectado se dejó sedimentar por 20 min en un tubo cónico de 50 mL. El paquete celular se lavó en dos tiempos de 15 min cada uno, en donde se agregaron 20 mL de la solución de Tyrode suplementada con 10 mM de lactato de

sodio, 0.50 mM HEPES y 0.01 % de polivinil alcohol (TL-HEPES PVA) a un pH de 7.3 a 7.4.

El botón celular se resuspendió en medio de lavado y se colocó en cajas Petri para seleccionar aquellos COCs que presentaran un citoplasma uniforme y cuando menos tres capas de células del cúmulo. Se lavaron tres veces para retirar restos celulares en 500 µL de medio TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato de sodio (In vitro, México) suplementado con glucosa 3 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, alcohol polivinílico 0.1% (v/v), cisteína 0.57 mM, factor de crecimiento epidérmico 10 ng/mL, penicilina 75 µg/mL, estreptomina 1 µg/mL, y se cultivaron 50 ovocitos por pozo, en cajas de 4 pozos (Nunc, EUA) conteniendo 500 µL de medio de maduración previamente cubierto con aceite mineral e incubado a 38.5°C con 5% CO₂ con medio de cultivo TCM-199 suplementado y con FSH 5 µg/mL y LH 5 µg/mL por 44 horas (Ducolomb, *et al.*, 2009).

8.3 Evaluación de la viabilidad y MIV

La evaluación de la viabilidad y de la maduración se realizó en el mismo ovocito mediante una técnica de doble tinción con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y Bisbenzimidaz (Hoechst 33258) (45 µg/mL). Se retiraron las células del cúmulo y los ovocitos se incubaron en una solución de MTT (5 mg/mL), en PBS, por un periodo de 30 minutos. Los ovocitos incoloros se catalogaron como muertos y los teñidos de color púrpura como vivos (Figura 4). La evaluación de viabilidad se realizó utilizando un microscopio estereoscópico. Posteriormente, para evaluar las etapas de la maduración nuclear, los ovocitos fueron teñidos con Hoechst 33258 en PBS aislados de la luz a 4°C por 40 minutos, posteriormente se fijaron con glutaraldehído al 2% de la misma forma que la tinción con Hoechst 33258 por 20 minutos y se colocaron en un portaobjetos con Glicerol-PBS (1:9). Los criterios de maduración nuclear fueron los siguientes: ovocitos con vesícula germinal (VG): Inmaduros; en metafase I (MI): en vías de maduración; y en metafase II (MII): maduros (Figura 5) (Casas, *et al.*, 2010).

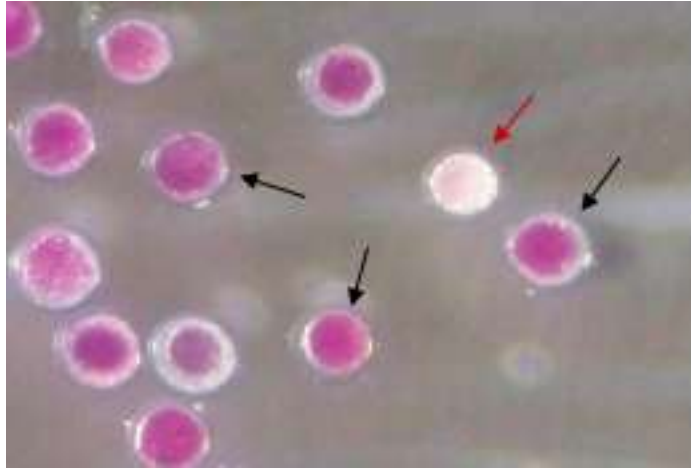


Figura 4. Evaluación de viabilidad con MTT. Flecha roja: ovocitos muertos; flecha negra: ovocitos vivos

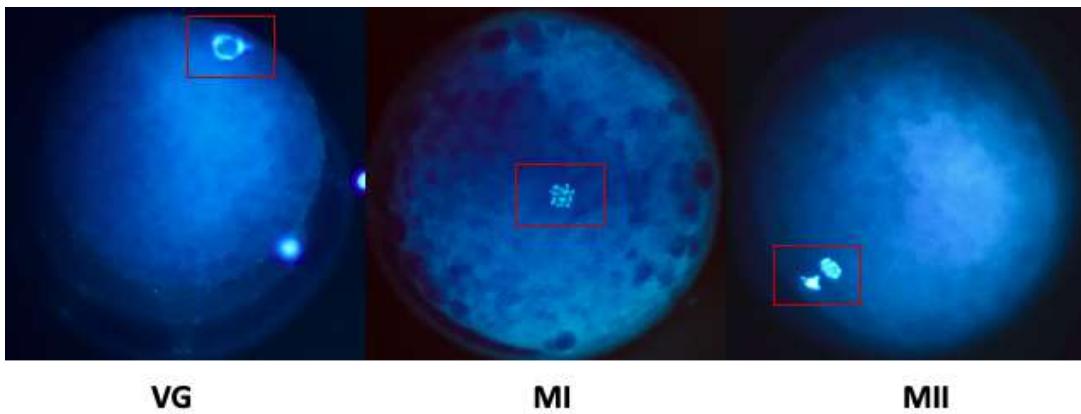


Figura 5. Evaluación del estado de maduración nuclear. VG: inmaduro; MI: en vías de maduración; MII: maduro.

8.4 Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por triplicado con 50 ovocitos por tratamiento. La correlación entre la concentración de MePB y su efecto entre la viabilidad de los ovocitos y su maduración fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r).

La CL_{50} y la CIM_{50} fueron calculadas por regresión lineal y no lineal, respectivamente. Los datos fueron normalizados, considerando al control de cada ensayo como 100% para la correlación de Spearman y la regresión lineal. El porcentaje de estados de maduración del grupo control y con MePB fueron comparados por análisis de varianza (ANOVA), con comparación múltiple de Duncan, con un nivel de confianza de $p < 0.05$, y los datos fueron presentados como el promedio \pm desviación estándar (DS).

9. RESULTADOS

En este trabajo se evaluó por primera vez el efecto del MePB en la viabilidad de ovocitos porcinos y su efecto en la MIV.

9.1 Viabilidad

El efecto de MePB sobre la viabilidad y la maduración fue evaluada a concentraciones de 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM . Después de las 44 h de MIV, se observaron alteraciones citoplasmáticas en los ovocitos (citoplasma retraído y con apariencia granular), así como un incremento en la dispersión de las CC, independiente del efecto de la expansión de las CC que ocurre de forma natural después de la maduración, en los COCs expuestos a 750 y 1000 μM (Figura 6). Sin embargo, la viabilidad no disminuyó significativamente en las concentraciones probadas (Figuras 7 y 9) de acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman ($r = -0.50$).

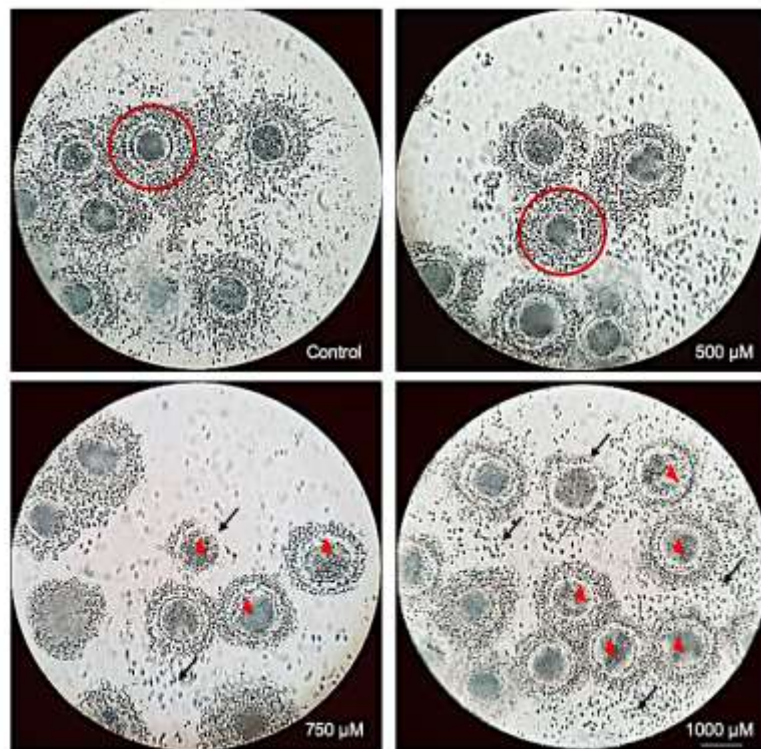


Fig. 6. Ovocitos expuestos a MePB después de 44 h de MIV. Ovocitos expuestos a 0, 500, 750 y 1000 μM . Los círculos muestran células del cúmulo compactas. Las flechas rojas indican alteraciones citoplasmáticas. Las flechas negras indican células del cúmulo dispersas. La barra indica 120 μM .

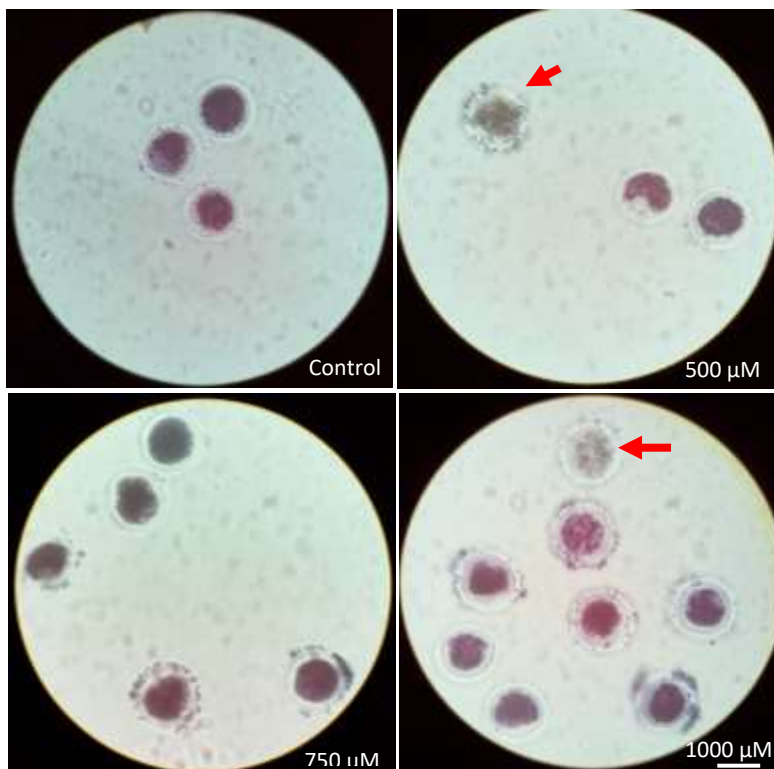


Fig. 7. Tinción con MTT de ovocitos expuestos a MePB después de 44 h de MIV. Se observa la viabilidad de los ovocitos expuestos a las concentraciones de 0, 50, 100, 500, 750 y 1000 μM . Las flechas rojas indican a los ovocitos muertos mientras el resto de los ovocitos permanecen vivos. La barra indica 120 μM .

9.2 Maduración *in vitro*

Después de las 44 horas de MIV, se observó una correlación entre la reducción progresiva de los ovocitos en MII y las diferentes concentraciones de MePB. En los ovocitos a concentraciones de 50, 100 y 500 μM no se observaron diferencias significativas respecto al grupo control; sin embargo, los ovocitos en MII expuestos a concentraciones de 750 y 1000 μM , mostraron una disminución significativa ($r=-0.74$) ($P<0.05$) comparados con el grupo control (Figura 8). El porcentaje de ovocitos en VG para las concentraciones de 0, 50 y 100 μM , no presentó diferencia significativa; por otro lado, a concentraciones de 750 y 1000 μM , la mayoría de los ovocitos permanecieron en arresto meiótico. Por último, no hubo diferencias respecto a los grupos de ovocitos que se encontraron en MI, en ninguno de los grupos.

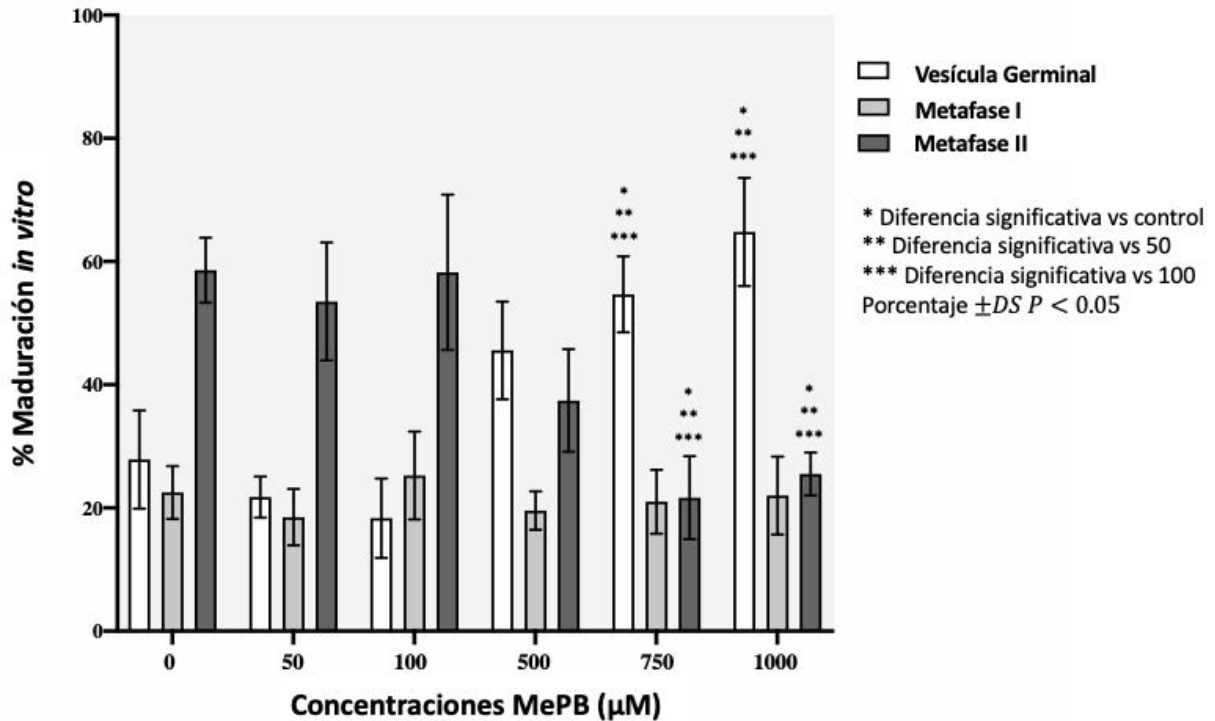


Fig. 8. Porcentaje de maduración *in vitro* después de la exposición al MePB. Porcentaje de ovocitos en vesícula germinal (VG), metafase I (MI) y metafase II (MII) después de la exposición a diferentes concentraciones durante la maduración *in vitro* (44 h). El porcentaje de ovocitos en VG incrementa a 750 y 1000 µM comparado con el control, 50 y 100 µM.

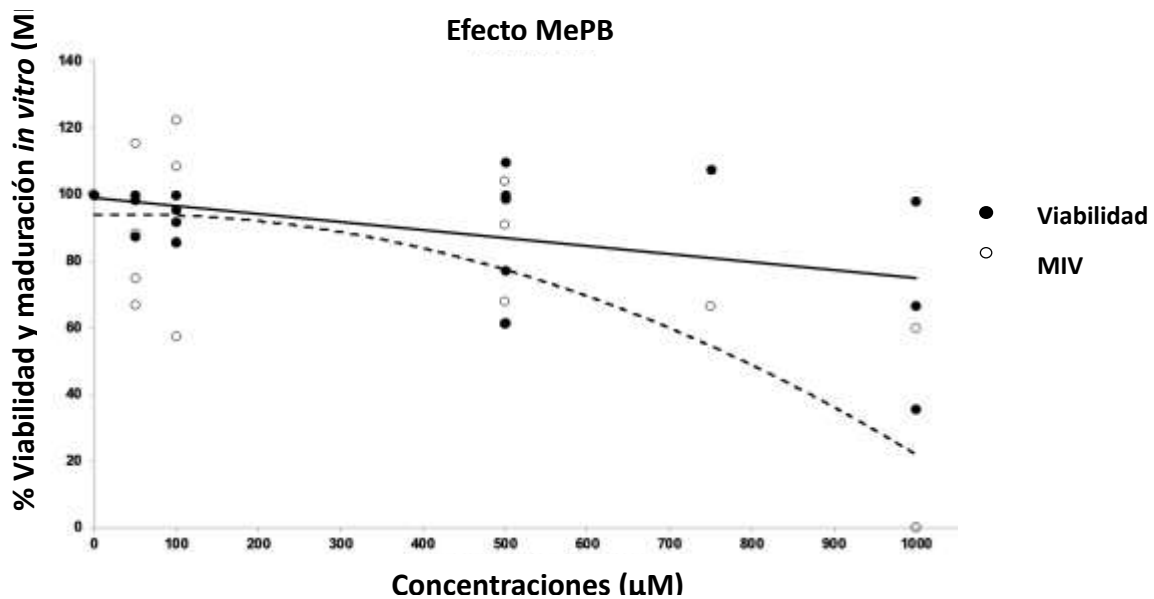


Fig. 9. Efectos del MePB en la viabilidad y la maduración *in vitro*. Ovocitos incubados con diferentes concentraciones de MePB durante 44 h. Viabilidad: círculos negros= porcentaje de viabilidad; línea continua= regresión lineal. Maduración: círculos blancos= porcentaje de maduración; línea punteada= regresión no lineal. Para la viabilidad, la correlación de Spearman fue significativa ($r = -0.50$, $P < 0.05$) y de acuerdo con la regresión lineal, $CL_{50} = 2028.38 \mu M$. Para la maduración, la correlación fue significativa ($r = -$

9.3 Determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀)

La CL₅₀ se obtuvo por medio de una regresión lineal y corresponde a un valor de 2028.38 µM (Figura 9), indicando que el MePB no presenta efectos citotóxicos en las concentraciones utilizadas.

9.4 Determinación de la concentración de la inhibición 50 (CIM₅₀)

La CIM₅₀ se obtuvo por medio de una regresión no lineal y corresponde a un valor de 780.31 µM (Figura 9).

10. DISCUSIÓN

Los PBs se encuentran en aproximadamente el 80% de los productos de cuidado personal (Pouillot, *et al.*, 2006), y en aproximadamente el 36% de productos del cuidado de bebés (Eriksson, *et al.*, 2008). Específicamente, el MePB se encuentra en el 48% de los productos cosméticos y del cuidado personal, por lo que la exposición a este compuesto es alta (Masten, 2005). En las mujeres, los PBs se han asociado a un decremento en la reserva ovárica (Smith, *et al.*, 2013) y a un acortamiento en el ciclo menstrual (Nishihama, *et al.*, 2016), siendo uno de los determinantes ambientales en la infertilidad. Los PBs han sido catalogados como DEs, afectando los niveles de estrógenos en la sangre y acortando la transición del ciclo de fase folicular a fase lútea, lo cual puede causar repercusiones a nivel reproductivo en procesos como la ovogénesis, y con ello, la maduración del ovocito. La especie porcina es altamente utilizada como modelos experimentales debido a su similitud fisiológica, anatómica, bioquímica y endócrina con la del ser humano (Petters, 1994). Por otro lado, los estudios toxicológicos donde se utiliza el modelo porcino (MIV/FIV) pueden inferir los efectos potenciales de ciertos compuestos con posible aplicación al ser humano (Santos, *et al.*, 2014).

10.1 Alteraciones citoplasmáticas y de la expansión de las células del cúmulo

En este estudio se muestra que el MePB afectó la integridad del citoplasma en el ovocito porcino. Uno de los parámetros para determinar la calidad de un ovocito y su habilidad para ser fertilizado es a través de la evaluación de su maduración nuclear y citoplasmática (Nevoral, *et al.*, 2014), los cuales dependen de la dinámica del citoesqueleto (Smith, 2001); ya que, por un lado, la cantidad y la redistribución de los organelos que conforman al ovocito le permitirán sostener el crecimiento del ovocito y posterior desarrollo del embrión, y por otro lado, la competencia meiótica, caracterizada por el rompimiento de la VG, el progreso a metafase I y la expulsión del cuerpo polar, así como la continuación a metafase II; lo cual le permitirá alcanzar el estado haploide necesario para el momento de la fertilización (Sun y Nagai, 2003; Rodríguez y Farin, 2004). En este trabajo encontramos que, a concentraciones de 750 y 1000 μM , el MePB alteró el citoplasma del ovocito, lo cual podría llevar a comprometer tanto la maduración citoplasmática como la reanudación de la MII. Aunado a esto, este trabajo concuerda con el trabajo de Meng, *et al.*, (2020), quienes observaron que el IBP produce daño al citoplasma del ovocito, específicamente al citoesqueleto, siendo el causante de anomalías en los filamentos de actina. Se sabe que los PBs pueden producir diferentes efectos biológicos, como la inhibición en el transporte de membranas y la función mitocondrial (Soni, *et al.*, 2005). Otro estudio evaluó la toxicidad causada por los PBs en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, encontrando que el transporte de estos compuestos depende del largo de la cadena de carbonos (Nakawa & Moldeus, 1999), por lo que, al ser el MePB de bajo peso molecular, podría tener una alta permeabilidad a través de las membranas celulares y, además, tener un efecto dentro de los ovocitos, comprometiendo los procesos que llevan a la reanudación de la maduración. Aunado a esto, recientemente Jeong, *et al.*, 2020, evaluaron el efecto del BuPB durante la maduración de ovocitos porcinos, comprobando que, a concentraciones de 300, 400 y 500 μM , se produce una distribución anormal de las mitocondrias, así como una reducción en su función. Esto muestra que el estado adecuado de las mitocondrias es esencial para la producción de ATP, la regulación de la homeostasis a partir de Ca^{2+} , su estado redox y la

transducción de señales; dichas características son requeridas para que los ovocitos puedan llevar a cabo su correcto desarrollo (Dumollard, *et al.*, 2009), por lo que la actividad mitocondrial es necesaria para la maduración del ovocito (Russo, *et al.*, 2014).

Por otro lado, observamos que el MePB redujo la expansión de las CC a concentraciones de 750 y 1000 μM , después de las 44 h de MIV. Uno de los procesos que ocurren durante la reanudación de la maduración del ovocito, es la síntesis de ácido hialurónico producido por las CC, las cuales a su vez producen su expansión. La importancia de la producción de una matriz extracelular rica en proteoglicanos, como es el caso del ácido hialurónico, reside en promover la expansión de las CC, además de ser una molécula que regula la comunicación entre las CC y los ovocitos, participando en la maduración meiótica, la fertilización y el DE (Yokoo, *et al.*, 2010; Nevoral, *et al.*, 2014). Debido a esto, la expansión de las CC es un indicador para determinar la calidad del ovocito *in vitro* (Nevoral, *et al.*, 2014). Además, la comunicación ovocito-CC a través de uniones comunicantes, es necesaria para que ocurra el arresto y la reanudación de la maduración del ovocito (Zhou, *et al.*, 2016) regulada a través de los niveles del AMPc transportados de las CC hacia el ovocito (Sirard, *et al.*, 1998). Algunos estudios han demostrado que las CC son susceptibles a agentes tóxicos debido a que una de sus funciones es proteger al ovocito de cualquier daño externo. Las CC se encuentran rodeando al ovocito, siendo las primeras en tener contacto con los agentes tóxicos. En este caso, el MePB a concentraciones de 750 y 1000 μM produjo desprendimiento de las CC (Fig. 6). Efectos similares fueron reportados por Meng, *et al.*, (2020) producidos por el IBP en concentraciones de 400 μM , mientras que Jeong, *et al.*, (2020), reportaron que el BuPB causa un decremento en la expansión de las CC a concentraciones mayores a 300 μM . En estudios realizados en COCs de cerdo y ratón expuestos a DEs, se observó una inhibición de la expansión de las CC, así como la aceleración de la reanudación de la maduración debido al daño producido en la comunicación del COC, o a través de la inhibición de la maduración debido a la disrupción de las comunicaciones (Acuña-Hernández, 2018; Domínguez, *et al.*, 2016). Estas uniones entre las CC y el ovocito son esenciales para

la reanudación de la meiosis, donde las proteínas de unión (conexinas) Cx43, Cx46 y Cx60, presentes en la especie porcina, participan en reanudación de la maduración del ovocito y, cualquier alteración en ellas, podría producir un efecto deletéreo, inhibiendo su maduración (Downs, 2001; Luciano, *et al.*, 2005; Tao, *et al.*, 2008; Zhou, *et al.*, 2016).

Se ha observado que otros compuestos tóxicos como los perfluorados (Domínguez, *et al.*, 2016) y el bisfenol A (Acuña-Hernández, *et al.*, 2018) producen daños en las células de la granulosa, así como una inhibición de las uniones gap, produciendo un decremento de la maduración del ovocito, por lo que los PBs podrían tener efectos similares, debido a que, cuando las CC se ven comprometidas, existe una repercusión en la maduración del ovocito. En el presente estudio se demostró que la mayoría de los ovocitos expuestos al MePB permanecen arrestados en VG, reduciendo las tasas de MII. En contraste, recientemente fue reportado que células de la granulosa humana expuestas a MePB y BuPB no afectan a los genes que regulan su esteroidogénesis, así como los niveles de progesterona ni la producción de estradiol (Herrera-Cogco, *et al.*, 2020). Sin embargo, es importante considerar las diferencias entre las células de la granulosa con capacidad esteroidogénica y las CC, las cuales no presentan dicha característica. Debido a que los PBs son considerados DEs, podemos hipotetizar que, *in vitro*, estos compuestos podrían interferir con los receptores de gonadotropinas localizadas en las CC, o alterar las uniones gap entre el ovocito y las CC, causando así un decremento en los mecanismos de reanudación de la maduración. En estudios futuros, proponemos evaluar el efecto que el MePB podría causar en estos receptores como un posible mecanismo de acción.

10.2 Viabilidad, MIV, CL₅₀ y CIM₅₀

De acuerdo con la literatura, el efecto del MePB en la viabilidad y maduración del ovocito porcino no ha sido reportado. En este estudio, encontramos que el efecto del MePB sobre la inhibición de la maduración del ovocito es mayor que la concentración que afecta su viabilidad (CIM₅₀=780.31 μ M; CL₅₀=2028.38), por lo que tomaría más del doble de CIM₅₀ para observar un efecto citotóxico. Por otro lado, este estudio muestra que el MePB produce baja citotoxicidad en los ovocitos en los rangos de concentración analizadas. En el trabajo de Meng, *et al.*, (2020), el número de ovocitos que presentaron apoptosis incrementó después de la exposición del IBP, mientras que en el trabajo de Jeong, *et al.*, (2020), encontraron que el BuPB produce autofagia y en mayor proporción apoptosis en ovocitos de cerdo expuestos a concentraciones a partir de 300 μ M. Anteriormente, un estudio reportó el potencial tóxico de los PBs en hepatocitos, mostrando que la citotoxicidad es proporcional al largo de la cadena de carbonos de los PBs (Nakagawa & Moldeus, 1998), por lo que concuerda con el efecto observado en ovocitos porcinos, donde el PB de cadena más corta, en este caso el MePB, produciría efectos citotóxicos a concentraciones mayores a las observadas en comparación con el IBP y el BuPB.

En cuanto a la maduración del ovocito, encontramos que la mayoría de los ovocitos expuestos a concentraciones de 750 y 1000 μ M permanecen arrestados en VG, disminuyendo su potencial de desarrollo. Por otro lado, el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la etapa de MII disminuyó considerablemente a concentraciones de 750 y 1000 μ M. En contraste con otros estudios donde reportan una disminución de la expulsión del primer cuerpo polar de ovocitos porcinos a partir de 200 μ M de IBP y una disminución en los ovocitos porcinos en MII a partir de 300 μ M de BuPB (Meng, *et al.*, 2020; Jeong, *et al.*, 2020). Otros de los efectos producidos por el IBP y BuPB son la producción de EROs, daño al ADN, así como la disminución de producción de glutatión. Se sabe que la producción de estrés oxidativo y el incremento de EROs produce una asincronía de la maduración citoplasmática y nuclear (Combelles, *et al.*, 2009; Miao, *et al.*, 2017). Nuestros resultados indican que se necesitan altas

concentraciones de MePB, entre 750 y 1000 μM , para producir un efecto deletéreo sobre la maduración de los ovocitos porcinos, comparado con los resultados de Meng, *et al.*, (2020), a concentraciones de IBP entre 200 a 400 μM y los resultados de Jeong, *et al.*, (2020) a concentraciones de BuPB entre 300 a 500 μM , por lo que el efecto de los PBs se incrementa respecto al largo de la cadena de carbonos, por lo que el IBP y el BuPB promueven efectos deletéreos a menores concentraciones que el MePB.

En este estudio, se determinaron la CL_{50} y la CIM_{50} del MePB, las cuales son equivalentes a 308.31 $\mu\text{g/mL}$ y 118.60 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Encontramos que las concentraciones en las cuales el MePB afecta la viabilidad y la MIV de los ovocitos porcinos, son mayores que las concentraciones reportadas en fluidos humanos, sin embargo, las concentraciones utilizadas en modelos *in vitro* no pueden ser necesariamente extrapolables a las concentraciones encontradas en la población humana en general. Mínguez-Alarcón, *et al.*, (2016) reportaron que las concentraciones de MePB presentes en la orina (133 ng/L) no estaban asociadas con problemas de FIV, en mujeres que se sometieron a tratamientos de fecundidad. Por otro lado, Smarr, *et al.*, (2017) reportaron que las concentraciones de MePB (31.9 ng/mL) y EtPB (1.09 ng/mL) encontradas en la orina, se asociaron en 37 y 33%, respectivamente, con la disminución de la fecundidad en parejas sometidas a tratamientos de este tipo. Además, Dodge, *et al.*, (2015) reportaron la presencia de MePB en la orina de personas expuestas a medicamentos que contienen PBs; en estos medicamentos las concentraciones de MePB fueron: fluoxetina 104 ng/mL, ibuprofeno 213 ng/mL y difenidramina 121-1166 ng/mL. Recientemente, el Informe Nacional sobre Exposición Humana a Químico Ambientales reportó concentraciones de MePB presentes en la orina de mujeres (72.8 $\mu\text{g/L}$) y en hombres (31.1 $\mu\text{g/L}$) (NRHEEC, 2019). Por otro lado, también se encontraron concentraciones de PBs en el plasma de mujeres, reportando la presencia de MePB (9.4 ng/mL), EtPB (<3 ng/mL) y PrBP (<2 ng/mL) (Sandanger, *et al.*, 2011). En mujeres embarazadas se encontraron niveles elevados de PBs durante su primer trimestre de gestación, donde específicamente el MePB se encontró entre los rangos de 117.84-177.21 ng/mg de creatinina (Jain, 2016). Se ha reportado también que en ratas la exposición al BuPB

durante la etapa prenatal produce desórdenes en el desarrollo de las crías (Ali & Elgoly, 2013). Consideramos que es importante conocer las concentraciones de PBs presentes en el fluido folicular, ya que es el sitio donde los ovocitos tendrían contacto de forma directa con los PBs *in vivo* y así entender de qué forma podrían estos xenobióticos afectar al proceso de maduración *in vitro*, así como su posterior impacto en la fertilización.

11. CONCLUSIONES

La exposición de los ovocitos porcinos al MePB durante la MIV produjo alteraciones en su morfología, así como reducción en la expansión de las CC, lo cual conduce a la disminución de la maduración del ovocito; sin embargo, se requieren concentraciones altas para observar dichos efectos. La exposición continua al MePB podría ser el detonante de algunos efectos que producen infertilidad en los mamíferos, incluido el ser humano.

12. PERSPECTIVAS

Se requieren más estudios de la evaluación del MePB para explicar el impacto que podría tener en la fertilidad.

La cuantificación de la síntesis del ácido hialurónico, el cual es un componente de la matriz extracelular, junto con la evaluación de las uniones comunicantes como las proteínas Cx43, Cx46 y Cx60, podrían explicar los mecanismos por los cuales las CC pierden su adhesión al ovocito.

Para evaluar las posibles causas del arresto en VG, podría considerarse la integridad citoplasmática a través de los filamentos de actina, ya que al dar origen al huso cromosómico durante la maduración y alteraciones en su estructura podrían llevar al arresto.

Otro posible parámetro son los niveles de glutatión reducido (GSH), pues sus niveles altos ayudan al ovocito a mantener un equilibrio en las EROs, debido a que su exceso puede producir estrés oxidante y causar la muerte celular.

La evaluación de la integridad de los receptores a LH y FSH, mediante técnicas moleculares como Westernblot, podrían ayudar a dilucidar si el MePB causa un daño en el estímulo de gonadotropinas y con ello disminuir la MIV.

Se recomienda evaluar la repercusión del MePB sobre la FIV y el subsecuente DE para siguientes trabajos.

13. REFERENCIAS

- Acuña-Hernández, D. G., Arreola-Mendoza, L., Santacruz-Márquez, R., García-Zepeda, S. P., Parra-Forero, L. Y., Olivares-Reyes, J. A., & Hernández-Ochoa, I. (2018) Bisphenol A alters oocyte maturation by prematurely closing gap junctions in the cumulus cell-oocyte complex. *Toxicol Appl Pharmacol.* 344:13-22. doi: 10.1016/j.taap.2018.02.011
- Albertini, D.F. (1994) The mammalian ovum: The physiology of reproduction, Knobil, E. y Neill, J.D., eds., Raven Press, Ltd., Nueva York, 1:79-122.
- Ali, E. H. A., & Elgoly, A. H. M. (2013) Combined prenatal and postnatal butyl paraben exposure produces autism-like symptoms in offspring: comparison with valproic acid autistic model. *Pharm Biochem Behav.* 111: 102-110. Doi: 10.1016/j.pbb.2013.08.016
- Asimakopoulou, A., Xue, J., Pereira, B., Lyer, A., Omer, K., Sami, S., Abdullah, T., Kannan, K. (2015) Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. 573-581.
- Aubert, N., Ameller, T., Legrand, J. (2012) Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food Chem Toxicol.* 50:445-454.
- Betancourt, M., Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y. (2003) Maduración de gamentos y fertilización. En: Jiménez LF, Merchant H (eds), *Biología Celular y Molecular*. México: Prentice Hall, 679-711.
- Bielanska-Osuchowska. (2006) Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproduc Biol.* 6:161-193.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W. (2014) Parabens. From environmental studies to human health. *Environ Int.* 67:27-42.
- Bonilla, E., Altamirano, M., Casas, E., Fierro, R., Ducolomb, Y., Betancourt, M. (2001) Identificación de reprotóxicos en el laboratorio. *Biología de la Reproducción II UAM-PUIS*. pp. 55-73.
- Brinkley, H. (1981) Endocrine signalling and female reproduction. *Biol Reprod* 24; 22-43.
- Byford, J., Shaw, L., Drew, M., Pope, G., Sauer, M., Darbre, P. (2002) Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80:49-60.
- Calafat, A., Ye, X., Wong, L., Bishop, A., Needham, L. (2010) Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect.* 118:679-85.
- Carlson, B. (2019) *Human embryology and developmental biology*. 6th edición. Elsevier. 1:23.
- Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Betancourt, M. (2010) Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicol In Vitro.* 24: 224-230.
- Casas, E., Fierro, E., Ducolomb, Y., Betancourt, M. (2015) Efecto de insecticidas en la fertilidad humana y animal. Eds. JR Eguibar, MC Cortés. A. Trujillo y E. Bonilla. BUAP, México pp 243-262. ISBN: 978-607-487-948-3.
- Casillas, F., Ducolomb, Y., Lemus, A., Cuello, C., Betancourt, M. (2015) Porcine embryo production following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with granulosa cell co-culture system. *Cryobiology.* 71:299-305.
- Combelles, C. M. H., Gupta, S., & Agarwal, A. (2009) Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online.* 18:864-880. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60038-7
- Costa, E., Spritzer, P., Hohl, A., Bachega, T. (2014) Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 58. 153–161.
- Darbre, P., Harvey, P. (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. *J Appl Toxicol.* 34:925-938.
- De los Reyes M. (2011) Maduración nuclear y citoplasmática in vitro en ovocitos de perra. *Spermova.* 1: 53-57.
- Dodge, L., Kelley, K., Williams, P., Williams, M., Hernández-Díaz, S., Missmer, S., Hauser, R. (2015) Medications as a source of paraben exposure. *Reprod Toxicol.* 52:93-100.
- Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Casas, E., Teteltilta, M., & Bonilla, E. (2016) Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicol In Vitro.* 35:93-99. doi: 10.1016/j.tiv.2016.05.011
- Downs, S. M. (2001) A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. *Zygote* 9:71-82. doi: 10.1017/s0967199401001071
- Ducolomb, Y., Casas, E., Romo, S., Bonilla, E. & Betancourt, M. (2012) La fertilización *in vitro* y sus aplicaciones en producción animal y en investigación básica. *Avances en biología de la reproducción*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 83-106.

- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., Betancourt, M. (2009) In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol Toxicol.* 25:623-633.
- Dumollard, R., Carroll, J., Duchen, M. R., Campbell, K., & Swann, K. (2009) Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Sem Cell Dev Biol.* 20:346-353. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.12.013
- Elder, R. L., (1984) Final report on the safety assessment of methyl-paraben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. *Journal of the American College of Toxicology* 3, 147-209.
- Eriksson, E., Andersen, H., Ledin, A. (2008) Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *J Hazard Mater*; 156:240–59.
- Eurell, J, Frappier, B. (2006) *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology.* Blackwell Publishing, USA.
- Flores, D., (2017) Efecto del malati3n en la maduraci3n in vitro de ovocitos porcinos y su asociaci3n con el estr3s oxidante. Tesis de doctorado. Universidad Aut3noma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Ciudad de M3xico. 90 pp.
- Centers for Disease Control and Prevention. Fourth Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, Updated Tables (January 2019). Atlanta, GA: U.S Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/exposurereport/>
- Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E., Barcel3, D. (2016) Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res.* 151:251-264.
- Gonz3lez-Doncel, M., Garc3a-Mauri3o, J., San, L., Beltr3n, E., Sastre, S. & Fern3ndez, C. (2013) Embryonic exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to propylparaben Effects on early development and post-hatching growth. *Environmental Pollution.* 184:360-369.
- Guo, Y., Kannan, K. (2013) A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environ Sci Technol.* 47:14442-14449.
- Jain, R. B. (2016) Impact of pregnancy on the levels of parabens and bisphenol A: data from NHANES 2005-2010. *J Chem.* Article ID 1529071. <https://doi.org/10.1155/2016/1529071>
- Jeong, P. S., Lee, S., Park, S. H., Kim, M. J., Kang, H. G., Nanjidsuren, T., Son, H. C., Song, B. S., Koo, D. B., Sim, B. W., & Kim, S. U. (2020) Butylparaben is toxic to porcine oocyte maturation and subsequent embryonic development following in vitro fertilization. *Int J Mol Sci.* 21:E3692. doi: 10.3390/ijms21103692
- Kardong, K. (2007) *Vertebrados: Anatom3a comparada, funci3n y evoluci3n.* 4ta. Edici3n. Mc Graw Hill. 14: 578.
- Liao, C., Chen, L., Kannan, K., (2013) Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. *Environ. Int.* 57–58: 68–74.
- 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.
- Lorenzen, E., Follmann, F., Jungersen, G., Agerholm, J. (2015) A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital *Chlamydia* infection. *Veterinary Research* 46:116.
- Luciano, A. M., Lodde, V., Beretta, M. S., Colleoni, S., Lauria, A., & Modina, S. (2005) Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5' - monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev.* 71:389–397. doi: 10.1002/mrd.20304.
- Masten, S. (2005) Butylparaben review of toxicological literature butylparaben [CAS no. 94-26- 8]. *Rev Toxicol Lit.* 1–64.
- Meng, F., Jiao, X., Chen, F., Zhang, X., Duan, Z., Ding, Z., Wu, D., Wang, Y., Zhang, S., Miao, Y. & Huo, L. (2020) Isobutylparaben negatively affects porcine oocyte maturation through increasing oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *Environ Mol Mut* 1-12. DOI 10.1002/em
- Miao, Y. L., Zhou, C., Cui, Z., Zhang, M., & Xiong, B. (2017) Postovulatory aging causes the deterioration of porcine oocytes via induction of oxidative stress. *Faseb J* 32:1328–1337. doi: 10.1096/fj.201700908R
- M3nquez-Alarc3n, L., Gaskins, A. (2017) Female exposure to endocrine disrupting chemicals and fecundity: a review. *Cur Opin Obstet Gynecol.* 29:202-211.
- Nakagawa, Y. & Moldeus, P. (1998) Mechanism of p-hydroxybenzoate ester induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 58:811-816. doi: 10.1016/s0006-2952(98)00097-5
- Nevoral, J., Ors3k, M., Klein, P., Petr, J., Dvor3kov3, M., Weingartov3, I., Vyskocilov3, A., Z3mostn3, K., Krejcov3, T. & J3lek, F. (2014) Cumulus cell expansion, its role in oocyte biology and perspectives of measurement: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica.* 4:212-225. doi: 10.1515/sab-2015-0002
- Nishihama, Y., Toshima, H., Yoshinaga, J., Mizumoto, Y., Yoneyama, M., Nakajima, D., Shiraishi, H., Tokuoka, S. (2017) *Environ Health Prev Med.* 22(1):5.

- Núñez, L., Tadeo, J., García-Valcárcel, A., Turiel, E. (2008) Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*; 1214:178–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.105>.
- Oishi, S. (2001) Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health*; 17:31–9.
- Petters, R. M. (1994) Transgenic livestock as genetic models of human disease. *Reprod Fertil Dev*. 6:643–645. doi: 10.1071/rd9940643
- Pouillot, A., Polla, B., Polla, A. (2006) Conservateurs en cosmetology mise au point sur les parabenes. *J Méd Esthét Chir Dermatol* 33:187–90.
- Ramaswamy, B., Kim, J., Isobe, T., Chang, K., Amano, A., Miller, T. (2011) Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure. *J Hazard Mater a*; 192:1739–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.006>.
- Rodriguez, K. F. & Farin, C. E. (2004) Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev*. 16(2):55-67.
- Russo, R., Monaco, D., Rubessa, M., El-Bahrawya, K. A., El-Sayed, A., Martino, N. A., Beneult, B., Ciannarella, F., Dell'aquila, M. E., Lacalandra, G. M., & Uranio, M. F. (2014) Confocal fluorescence assessment of bioenergy/redox status of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes before and after *in vitro* maturation. *Reprod Biol Endocrinol*. 12:16. doi: 10.1186/1477-7827-12-16.
- Sadler, T. W. & Langman. (2012) Embriología médica, 12ª Edición. Barcelona, España: Ed. Lippincott/Williams & Wilkins. Pág. 22 y 23.
- Samarasinghe, S., Krishnan, K., Naidu, R., Megharaj, M., Miller, K., Fraser, B., Aitken, R. (2018) Parabens generate reactive oxygen species in human spermatozoa. *Andrology*. Doi: 10.1111/andr.12499.
- Sandanger TM, Huber S, Moe MK, 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* 21:595–600. doi: 10.1038/jes.2011.22
- Santos, R., Schoevers, E., & Roelen, B. (2014) Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reprod Biol Endocrinol*. 26:112-117. doi: 10.1186/1477-7827-12-117
- Senger PL (2005) Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions Inc., Washington
- Sirard, M. A., Richard, F., Mayes, M. (1998) Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*. 49:483-497.
- Silverthorn DU (2007) Human Physiology. Pearson Benjamin Cummings, United States of America
- Smith, G. D. (2001) *In vitro* maturation of oocytes. *Curr Womens Health Rep*. 12:143-151.
- Smith, K. W., Souter, I., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P. L., Calafat, A. M. & Huaser, R. (2013) Urinary paraben concentrations and ovarian aging among women from a fertility center. *Environ Health Perspect* 121:1299-1305. doi: 10.1289/ehp.1205350
- Sun, Q. Y. & Nagai, T. (2003) Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev*. 49:347-359.
- Tao, Y., Cao, C., Zhang, M., Fang, F., Liu, Y., Zhang, Y., Ding, J., & Zhang, X. (2008) Effects of cumulus cells on rabbit oocyte *in vitro* maturation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92:438–447. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00729.x.
- Teteltitla, M. (2014) Evaluación de la viabilidad, maduración y efecto genotóxico en ovocitos y células del cúmulo porcinos expuestos a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) *in vitro*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México. 84 pp.
- Wassarman, P.M. (1989) La fecundación en los mamíferos. *Investigación y Ciencia* 149:48-55.
- Xue, J., Kannan, K. (2016) Accumulation profiles of parabens and their metabolites in fish, black bear, and birds, including bald eagles and albatrosses. *Environ Int*. 94:546-553.
- Yanagimachi, R. (1994) Mammalian fertilization. En: Knobil E, Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*, Segunda ed. New York: Raven Press, Ltd., 189-316.
- Yang, C., Lim, W., Bazer, F., Song, G. (2018) Butyl paraben promotes apoptosis in human trophoblast cells through increased oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress. *Environ Toxicol* 33:436-445.
- Yokoo, M., Kimura, N., & Sato, E. (2010) Introduction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *Journal of Reproduction and Development*, 56:15-19. doi:10.1262/jrd.09-173e
- Young, J. M. & McNeilly, A. S. (2010) Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Society for Reproduction and Fertility*. 1470-1626. Doi: 10.1530/REP-10-0094
- Zhou, C. J., Wu, S. N., Shen, J. P., Wang, D. H., Kong, X. W., Lu, A., Li, Y. J., Zhou H, X., Zhao, Y. F., & Liang, C. G. (2016) The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice. *PeerJ* 4:e1761. doi: 10.7717/peerj.1761
- Soni, M., Carabin, IG, Burdock GA (2005) Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*. 43:985-1015.

- Céline Campagna, Christine Guillemette, René Paradis, Marc-André Sirard, Pierre Ayotte, Janice L. Bailey, (2002) An Environmentally Relevant Organochlorine Mixture Impairs Sperm Function and Embryo Development in the Porcine Model, *Biology of Reproduction*, Volume 67, Issue 1, 1, Pages 80–87, <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.80>
- Ducolomb, Y., Romo, S., Balcázar, J., Rodarte, L., Casas, E., Del Carmen, G., Sciutto, E., Betancourt, M. (2005) Primeros cerdos nacidos en México a partir de embriones producidos in vitro. *Téc Pecu Méx* 43(3):425-432.
- Leung, P. & Adashi, E. (2004) *The Ovary*. Elsevier Academic Press. San Diego, California, U.S.A. 701p.

14. ANEXOS

14.1 Preparación de medios

Solución salina: Para transportar ovarios y hacer lavados

Mantiene la homeostasis de los ovarios durante el transporte al laboratorio.

- NaCl 9.2 gr. Por 1 L de agua destilada

TL-HEPES-PVA: Lavado de ovocitos después de puncionar ovarios

	g/L	g/500mL	g/250mL
NaCl	6.6633	3.33165	1.665
KCl	0.2386	0.1193	0.059
NaH ₂ PO ₄	0.0408	0.0204	0.0102
Na-Lactato	1.4	0.7	0.35
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.1017	0.05085	0.025
HEPES	2.383	1.1915	0.5957
Na-Piruvato	0.022	0.011	0.0055
Sorbitol	2.186	1.093	0.545
NaHCO ₃	0.168	0.084	0.042
Gentamicina	0.0250	0.0125	0.0062
Penicilina G	0.065	0.0325	0.01625
PVA	0.1	0.050	0.025
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.294	0.147	0.0735

1. Tomar 500 mL de agua desionizada (medir con la probeta, poner la mitad en un vaso para agregar las sales).
2. Ajustar pH 7.3-7.4
3. Aforar a 500 mL
4. Filtrar

Nota: Filtrar cada semana. Duración 3 semanas.

TCM-199 (Tissue culture medium): Suplementación del medio de maduración de ovocitos

	100ml	50ml
PVA	0.1 gr	0.05 gr
D-Glucosa	0.05496 gr	0.02748 gr
Ac. Pirúvico	0.01 gr/8 μ l	0.005 gr/4 μ l
Estreptomicina	5mg	0.0025 gr
Penicilina	7.5mg	0.00375 gr

1. Tomar la mitad de medio TCM-199, agregar en un vaso y agregar las sales.
2. Aforar con la otra mitad de medio TCM-199
3. Filtrar
4. Guardar a 4°C
5. Debe suplementarse el día de la colecta de ovarios, de la siguiente forma:

Suplemento de TCM-199, el día de la MIV

1. Tomar 9.5 mL de TCM-199 y agregar a un tubo de 15 ml
2. Tomar 2.5 mL de TCM-199 y agregar a un tubo de 5 ml
3. Pesar 0.0033 gr de cisteína y agregar al tubo de 2.5 ml. Mezclar suavemente.
4. Tomar 500 μ L del tubo de 2.5 con cisteína y agregar al tubo de 9.5 mL, para completar los 10 mL
5. Tomar 500 μ L de EGF y agregarlos al tubo ya con 10 mL (por cada 10 ml se agregan 100 μ l de EGF)
6. Filtrar en un tubo de 15 mL nuevo
7. Preparar 3 cajas Petri de 35 mm y cajas de 4 pozos
8. Etiquetar y meter a la incubadora con tapa NO CERRADA, tanto los tubos donde se suplementó el medio TCM-199 como las cajas (para permitir la entrada de CO₂ y se calibre el pH)

Suplemento de PBS-BSA: Para evitar adhesión a las puntas

- 0.003 gr de BSA (8022) por mL de PBS

14.2 Preparación de hormonas

Hormonas: Para la estimulación de la MIV

- Hormona Luteinizante (LH): Mejora las condiciones de maduración in vitro, modificando el ambiente nutricional aumentando la energía disponible para el ovocito. Además, impide los efectos inhibitorios que actúan sobre el gameto, logrando de ese modo la ruptura de la vesícula germinal.
- Hormona Folículo Estimulante (FSH): Induce in vitro la expansión de las células del cúmulo, a través de la síntesis de piruvato y ácido hialurónico. También participa en el bloqueo de la poliespermia durante la fecundación, por la síntesis de los gránulos corticales.

Preparación:

Solución stock 10x

1. Pesar 0.005 g (5 mg) de FSH/LH
2. Vaciar en un tubo de 15 mL
3. Añadir 10 mL de medio mínimo TCM-199
4. Homogeneizar

Solución 1x

1. De la solución stock, tomar 1 mL y llevarlo a 10 mL con TCM-199 mínimo. (1 mL de stock + 9 mL de TCM-199)
2. Filtrar solución
3. Preparar viales de un volumen de 50 μ L
4. Congelar a -20° C

*El medio se añade por las paredes del tubo para no hacer burbujas.

14.3 Dilución de MePB

Solución stock MeBP

Solubilidad de los parabenos en H₂O:

➤ 2.5 gr/L a 25°C

Metil 4-hidroxibenzoato (Sigma)

Peso molecular: 152.15 g/mol

152.15 gr/mol - 1000 mL - 1 M

2.5 gr - 1000 mL es a: 0.0164 M = 16.4 mM (milimolar)

Preparación stock

	1 lt	50 ml	10 ml
MePB	2.5 g	0.125 g	0.025 g

1. Tomar el volumen deseado de medio TCM-199 (sin suplementar) con la probeta.
2. Agregar en un vaso de precipitado y calentar a 40°C
3. Agregar la cantidad correspondiente del MePB
4. Ajustar pH=6.4
5. Filtrar, etiquetar y guardar a 4°C

Preparación concentraciones MePB

- 1000 µM = 30.48 µl MePB y 469.52 de TCM-199
- 750 µM = 22.86 µl MePB y 477.13 µl de TCM-199
- 500 µM = 15.24 µl MePB y 485 µl de TCM-199
- 100 µM = 3.048 µl MePB y 497 µl de TCM-199
- 50 µM = 1.52 µl MePB y 498.5 µl TCM-199

14.4 Tinciones

Azul de tetrazolio (MTT)

0.5 mg/mL = 0.0005 g/mL

Para preparar 5 mL:

0.025 gr de azul de tetrazolio/ 5 mL de PBS

Procedimiento

1. Después de denudar los ovocitos madurados de forma mecánica, se pasan a otra caja con PBS-BSA para lavarlos.
2. Quitar el exceso de PBS-BSA, procurando que los ovocitos nunca queden secos y sobre las orillas de pozo.
3. Colocar 200 μ L de MTT.
4. Meter en incubadora por 30 minutos.
5. Quitar exceso de MTT, de la misma forma que el PBS-BSA.
6. Hacer dos lavados con PBS-BSA.
7. Retirar exceso de PBS-BSA.
8. Proseguir con la tinción de Hoechst.

Hoechst: Tinción nuclear

- Solución STOCK (Peso molecular: 562)

1 mg/mL \rightarrow 0.001g de Hoechst/mL de PBS

Nota: Almacenado a congelación hasta por 1 año. Concentración final 45 μ L/mL

- Solución final

= 0.225 mL = 225 μ L de Hoechst y 4775 μ L de PBS, para un volumen total de 5 mL.

Procedimiento

1. Colocar 300 μ l de Hoechst.
2. Cubrir con papel aluminio y colocar a 4°C por 45 minutos.
3. Quitar exceso de Hoechst.
4. Hacer dos lavados con PBS-BSA
5. Quitar todo el sobrenadante.
6. Agregar 500 μ l de glutaraldehído por 20 minutos PARA FIJARLOS.
7. Lavar dos veces con PBS-BSA
8. Montar con glicerol-PBS (1:9).

Glutaraldehído: para fijar

- 5 ml PBS + 50 μ l de glutaraldehído



Medio de montaje

- 9 ml de glicerol/1 ml de PBS

Nota: para células vivas se recomienda usar agua mili-Q, para montar, agua destilada.

SHORT COMMUNICATION

Effects of methylparaben on in vitro maturation of porcine oocytes

Adyeni Barajas-Salinas^{1,2} | Yvonne Ducolomb PhD^{2†} | Miguel Betancourt PhD² |
Elivier Núñez-Macías² | Alma López MSc² | Jaime Barraza² |
Juan Quezadas-Fuentes³ | Iván Bahena-Ocampo PhD² | Edmundo Bonilla PhD²  |
Socorro Retana-Márquez PhD³ | Eduardo Casas PhD² | Fahiel Casillas PhD³ 

¹Master's Degree in Animal Reproduction
Biology, Metropolitan Autonomous University-
Iztapalapa Campus, Mexico City, Mexico

²Department of Health Sciences, Metropolitan
Autonomous University-Iztapalapa Campus,
Mexico City, Mexico

³Department of Biology of Reproduction,
Metropolitan Autonomous University-
Iztapalapa Campus, Mexico City, Mexico

Correspondence

Fahiel Casillas, Department of Biology of
Reproduction, Metropolitan Autonomous
University-Iztapalapa Campus, Av. San Rafael
Atlixco 186, Leyes de Reforma, 09340 Mexico
City, Mexico.
Email: fahiel@xanum.uam.mx

Eduardo Casas, Department of Health
Sciences, Metropolitan Autonomous
University-Iztapalapa Campus, Av. San Rafael
Atlixco 186, Leyes de Reforma, 09340 Mexico
City, Mexico.
Email: dino@xanum.uam.mx

Funding information

CONACYT Scholarship to Adyeni Barajas-
Salinas, Grant/Award Number: 932048

Abstract

Parabens (PBs) are compounds widely used in industry for food and personal care products as antimicrobials and preservatives. Their indiscriminate use has resulted in their detection in different ecosystems so that humans and other organisms are highly exposed. Methylparaben (MePB), compared with other PBs, is mostly detected in food, personal care and baby care products. PBs could be linked to the generation of hormonal disorders and fertility impairment since their recent classification as endocrine disruptors. The knowledge of the effects that MePB can exert is of great importance as, in terms of reproduction, information is limited. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of MePB on porcine oocyte viability and in vitro maturation (IVM), as well as to determine the lethal concentration at 50% (LC₅₀) and the maturation inhibition concentration at 50% (MIC₅₀). Oocytes were exposed to different MePB concentrations 0 (control), 50, 100, 500, 750 and 1000 μM during 44 h of IVM. Cytoplasmic alterations and reduced cumulus cell expansion were observed in oocytes exposed to MePB; however, viability was not affected. In addition, oocyte maturation decreased in a concentration-dependent manner after exposure to MePB. The estimated LC₅₀ was 2028.38 μM, whereas MIC₅₀ was 780.31 μM. To our knowledge, this is the first study that demonstrates that MePB altered porcine oocyte morphology, and caused a reduction in cumulus cell expansion, both of which resulted in decreased oocyte maturation. Therefore, MePB exposure may be one of the factors involved in fertility impairment in mammals, including that of humans.

KEYWORDS

in vitro maturation, methylparaben, parabens, porcine oocytes, viability

1 | INTRODUCTION

Parabens (PBs) are compounds widely used as preservatives in industry for food and everyday hygiene products, and as excipients in drugs (Guo & Kannan, 2013). PBs are also found in dust and indoor air, which increases the risk of human and animal exposure (Błędzka, Gromadzińska, & Wąsowicz, 2014). Their indiscriminate use has resulted in their detection in different ecosystems so that humans and other organisms are highly exposed. PBs are esters of p-hydroxybenzoic acid, with an alkyl substituent, and depending on the length of the chain are classified into methyl (MePB), ethyl (EtPB), propyl (PrPB) and butyl (BuPB) PBs (Błędzka et al., 2014). In several products, MePB and PrPB are frequently used, and may appear alone or in combination (Núñez, Tadeo, García-Valcárcel, & Turiel, 2008). The US Food and Drug Administration (FDA) indicated that the use of PBs is safe, and the World Health Organization determined that the acceptable daily intake of MePB, EtPB and PrPB, in conjunction, is 10 mg/kg/24 h (Soni, Carabin, & Burdock, 2005). However, the daily exposure to PBs is calculated at 76 mg: with food accounting for 1 mg/day, cosmetics and personal care products for 50 mg/day and medications for 25 mg/day (Soni et al., 2005). In the food and personal care products industry, MePB is one of the most used preservatives. Liao, Chen and Kannan (2013) reported that PBs are present in vegetables (109 ng/g), condiments (74.5 ng/g) and cereals (25.2 ng/g). In addition, Guo and Kannan (2013) reported that among PBs, MePB was the most frequently detected compound in leave-on personal care (64%) and baby care products (60%). Therefore, the proposed pathways of entry of PBs into the body are ingestion, inhalation and dermal absorption, the last being one of the most important due to its widespread use in personal care products (Dodge et al., 2015). Studies from the National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals (NRHEEC) in the US population between 2005 and 2006, detected that MePB (56.4 µg/L, urine concentration) and PrPB were present in most of the people analyzed, at 99.1% and 92.7%, respectively, while BuPB was present only in 40% of the samples (Dodge et al., 2015). Recently, the fourth NRHEEC in the US population reported the MePB concentrations in female (72.8 µg/L) and male (31.1 µg/L) urine samples (NRHEEC, 2019). According to Aubert, Ameller and Legrand (2012), short-chain PBs such as MePB are absorbed more readily into tissues than long-chain PBs. As already mentioned, MePB is one of the most used compounds in different product formulations and is one of the most abundant PBs detected in the liver, kidney, tissues and plasma of different animal species (Xue & Kannan, 2016). PBs are emerging organic contaminants that can alter the average balance of endocrine systems, which is why these products are considered endocrine disruptors (EDs) (Costa, Spritzer, Hohl, & Bachega, 2014; Giulivo, Lopez de Alda, Capri, & Barceló, 2016). They can negatively interfere with the production, secretion, metabolism, transport or peripheral action of endogenous hormones through binding to hormone receptors (Byford et al., 2002; Oishi, 2001). EDs can trigger two types of response, i.e., mimic the hormonal action, called the agonist effect, or cause a lack of response and prevent the binding of the natural hormone, which is called the

antagonist effect (Costa et al., 2014). In this regard, in MCF7 breast cancer cells at concentrations of 10^{-6} M, PBs can stimulate their proliferation via estrogen through competitive inhibition of ^3H estradiol binding to MCF7 cell estrogen receptors. Therefore, the binding of PBs to estrogen receptors of MCF7 cells increased their proliferation (Byford et al., 2002). EDs can produce an indirect effect rather than a direct effect on hormone receptors. Kim et al. (2019) reported that PrPB (0.25-0.5 mM) decreases the viability of human placental BeWo cells by apoptosis. Samarasinghe et al. (2018) reported that MePB (13 mM) decreases sperm motility, and that the mixture of PBs (1-4 mM) decreases sperm viability. It was also reported that BuPB inhibits human trophoblast cell proliferation and increases the production of reactive oxygen species (ROS), inducing apoptosis at concentrations of 200 µM (Yang, Lim, Bazer, & Song, 2018).

In terms of the reproductive system, some studies support that PBs cause adverse effects on reproduction. In women, Mínguez-Alarcón and Gaskins (2017) reported an approximate reduction of 40% in fertility when MePB and EtPB were detected in urine. Smarr, Sundaram, Honda, Kannan and Louis (2017) reported that MePB (31.9 ng/mL) and EtPB (1.09 ng/mL) urine concentrations were associated with a 37% and 33% reduction in couple fecundity, respectively. Another study indicated a relationship between the concentrations of PBs and the shortening of the menstrual cycle, affecting fertility (Nishihama et al., 2016). In young male rats, PBs diminished the size and weight of the epididymis and seminal vesicles, and reduced testosterone levels causing low sperm production (Oishi, 2001). Moreover, in female rats MePB, EtPB, PrPB, iso-PrPB and BuPB exposure increased the weight of the ovaries (Vo, Yoo, Choi, & Jeung, 2010). In zebrafish embryos, PBs can affect their survival rates at concentrations >1000 g/L, and at concentrations >400 g/L, histological alterations and delayed embryonic development are evident (González-Doncel et al., 2013). However, few reports have evaluated the effect of these compounds in gametes, and most of them have been carried out *in vivo*, but not *in vitro* (Błędzka et al., 2014). *in vitro* studies indicated that MePB at 13 mM (a concentration equivalent to that contained in vaginal lubricants) inhibited sperm motility in a concentration-dependent manner. At 1-4 mM, the mixture of MePB, EtPB, PrPB and BuPB exacerbates these effects (Samarasinghe et al., 2018). As far as we know, only Meng et al. (2020) and Jeong et al. (2020) have evaluated the effect of isobutyl-paraben (IBP) and BuPB in porcine oocytes, respectively. Pigs are used as experimental models because their physiology, anatomy, biochemistry and endocrine system are similar to those of humans (Petters, 1994). Therefore, porcine reproductive toxicology studies (*in vitro* maturation [IVM]/*in vitro* fertilization) can suggest the potential effect of certain compounds with possible applications in humans (Santos, Schoevers, & Roelen, 2014).

As MePB is one of the most commonly used PBs and that, according to the literature, information about its effects on oocytes is limited, the objective of the present study was to evaluate the effect of MePB on porcine oocyte viability and IVM, as well as to determine

the lethal concentration at 50% (LC₅₀) and maturation inhibition concentration at 50% (MIC₅₀).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experimental design

This study was performed under the Ethics Committee regulations for the care and use of animals at the Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa Campus. Three replicates were performed for all experiments with at least 50 cumulus-oocyte complexes (COCs) per treatment. To evaluate the effect of MePB and to determine LC₅₀ and MIC₅₀, different concentrations were used: 0 (control), 50, 100, 500, 750 and 1000 µM. COCs were randomized within treatments.

2.2 | Methylparaben treatment

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company. For use, MePB (number 99-76-3) was dissolved and diluted in a culture medium for IVM (TCM-199; in vitro Mexico) to obtain the final concentrations of 0 (control), 50, 100, 500, 750 and 1000 µM. These concentrations were selected within the range reported in human breast cancer cells (MCF7) by Byford et al. (2002). For the preparation of the stock solution, 0.125 g MePB were dissolved in 50 mL of TCM-199.

2.3 | Oocyte collection and in vitro maturation

Ovaries were collected from approximately 225 prepubertal female gilts at the slaughterhouse "Los Arcos" (State of Mexico) and transported to the laboratory in a 0.9% NaCl solution at 25°C in <2 hours. The facility mentioned above has animal health federal law authorization under number 6265375. Oocytes were recovered from approximately 450 ovaries. For COCs collection, ovarian follicles between 3 and 6 mm in diameter were punctured to obtain the follicular fluid. Follicular contents were left to sediment and were washed twice with a Tyrode modified medium, supplemented with 10 mM sodium lactate, 10 mM HEPES and 1 mg/mL polyvinyl alcohol (PVA) (TL-HEPES-PVA) at pH 7.3-7.4. Oocytes selected were those with normal cytoplasm surrounded at least by a three- to four-layer compact mass of cumulus cells. Then, COCs were washed three times in 500 µL drops of maturation medium: TCM-199 with Earle's salts and sodium bicarbonate supplemented with 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine and 10 ng/mL epidermal growth factor, 0.5 µg/mL luteinizing hormone and 0.5 µg/mL follicle-stimulating hormone. COCs were placed in each well of a four-well dish (Thermo-Scientific Nunc) containing 500 µL of maturation medium in control, and different MePB concentrations. Finally, COCs were

incubated at 38.5°C, with 5% CO₂ in air and humidity at saturation for 44 hours (Ducolomb et al., 2009).

2.4 | Evaluation of oocytes viability and in vitro maturation

After treatment, COCs were denuded mechanically and transferred to a 200 µL drop of 0.5 mg/mL methyl-thiazolyl-tetrazolium diluted in modified Tris-buffered medium. After 30 minutes, oocytes were observed under a light microscope for oocyte viability evaluation (Zeiss Axiostar). Oocytes with purple coloration were considered viable and colorless ones nonviable. Maturation was evaluated by bisbenzimidazole (Hoechst 33342) staining in all treatments. Oocytes were stained with 10 µg/mL Hoechst for 45 minutes using an epifluorescence microscope (Zeiss Axiostar) at 40x for observation (Casas, Bonilla, Ducolomb, & Betancourt, 2010). Oocytes with a germinal vesicle (GV) or in metaphase I (MI), were considered immature, and those in metaphase II (MII) with the first polar body as matured.

2.5 | Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate with at least 50 COCs per treatment. The correlation between MePB concentration and its effect on oocyte viability and maturation was assessed using the Spearman's rank correlation coefficient (*r*). The concentrations required to produce death in 50% of the oocytes (LC₅₀) and to inhibit the maturation in 50% of the oocytes (MIC₅₀) were calculated by a linear and nonlinear regression, respectively. Data were normalized, and controls were considered as 100% for both, Spearman correlation and regression. The percentage of meiotic stages in control and MePB treatments were compared by one-way analyses of variance with Duncan's post-hoc multiple comparison with a confidence level of *P* < .05, and data are presented as mean ± SD.

3 | RESULTS

For the first time, we evaluated the effect of MePB in porcine oocyte viability and IVM. After 44 hours of IVM, oocyte cytoplasmic alterations (retracted and granular cytoplasm), reduced cumulus cell expansion and increased cumulus cell dispersion were observed in COCs exposed to MePB at 750 and 1000 µM (Figure 1). The effects of MePB on oocyte viability and maturation were analyzed at 0 (control), 50, 100, 500, 750 and 1000 µM concentrations. Viability was not significantly affected in the concentration range assayed. However, a progressive reduction in oocyte maturation was correlated with increasing MePB concentrations. Spearman's correlation was not significant for viability (*r* = -0.50), and significant for maturation (*r* = -0.74). Accordingly, the estimated LC₅₀ was 2028.38 µM, whereas MIC₅₀ was 780.31 µM (Figure 2).

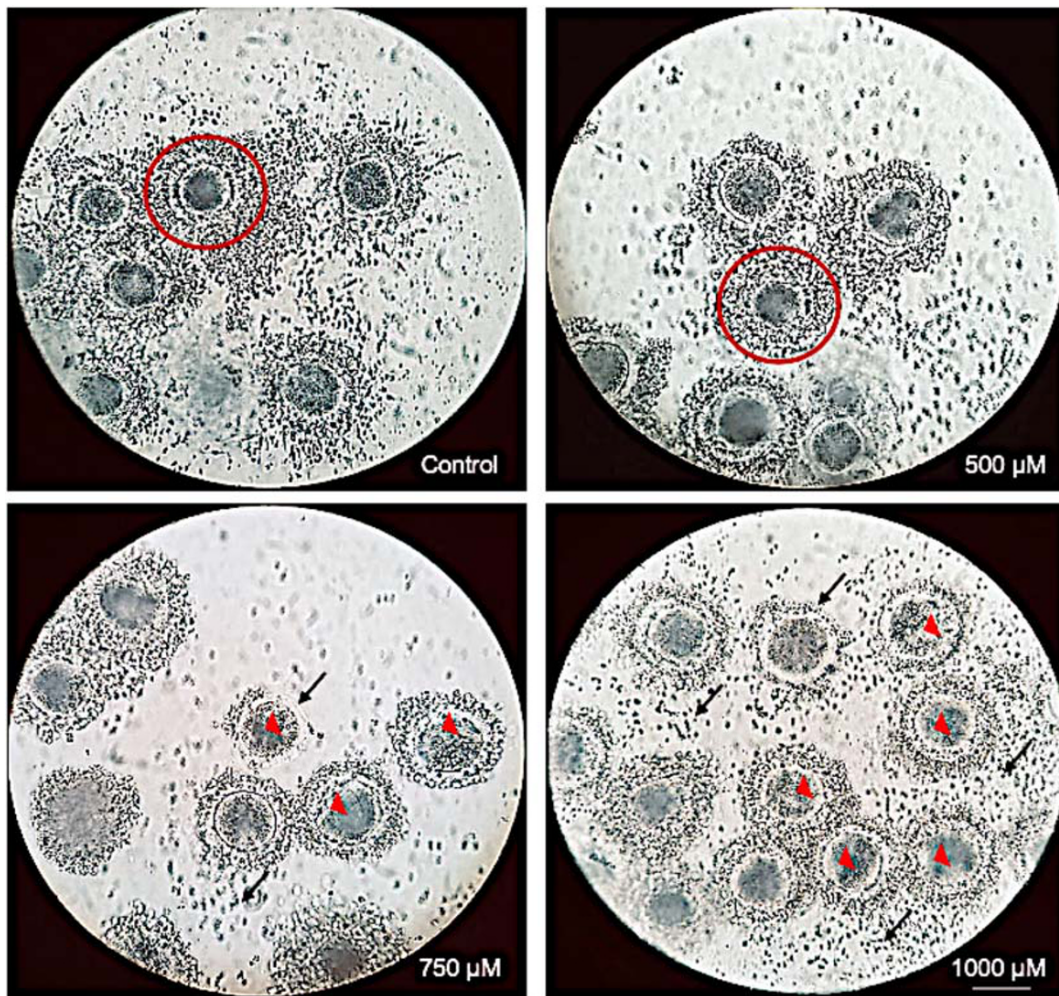


FIGURE 1 Representative images of oocytes exposed to MePB after 44 h of in vitro maturation. Oocytes exposed to 0 (control), 500, 750 and 1000 μM MePB after 44 h of in vitro maturation. Circles show cumulus cells in compact layers. Arrowheads indicate oocyte cytoplasm alterations (retracted and granular cytoplasm), and arrows show dispersed cumulus cells after MePB exposure. In 750 and 1000 μM MePB exposure, cytoplasm alterations, reduced cumulus cell expansion and dispersed cumulus cells were observed. Scale bar = 120 μm . MePB, methylparaben

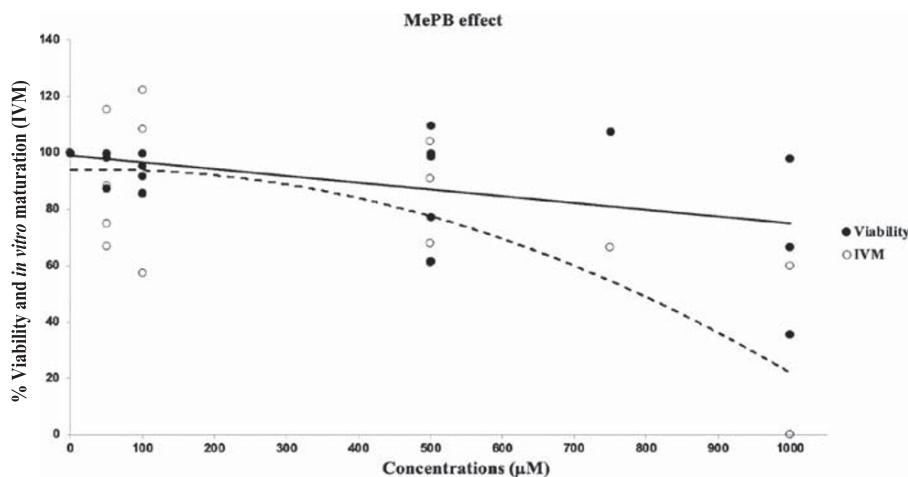
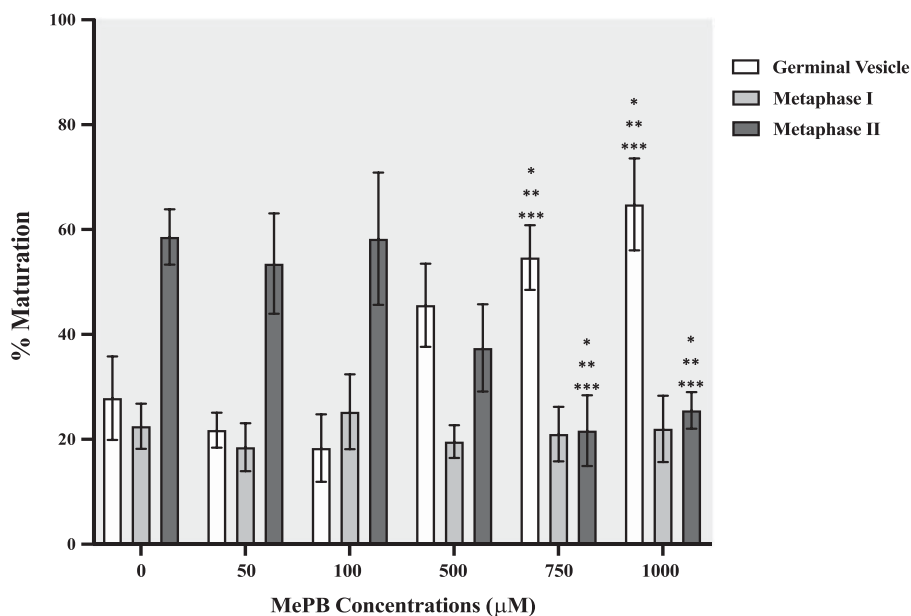


FIGURE 2 MePB effect on the viability and IVM of porcine oocytes (closed circles: viability percentage; continuous line: linear regression; open circles: maturation percentage; dashed line: nonlinear regression). Oocytes incubated in the presence of MePB during the 44 h of culture. Data were normalized for each assay. For viability, Spearman correlation was not significant ($r = -0.50$, $P > .05$), and according with regression, LC_{50} was 2028.38 μM . For maturation, correlation was significant ($r = -0.74$, $P < .05$), and according with regression, the estimated MIC_{50} was 780.31 μM . IVM, in vitro maturation; MePB, methylparaben

Regarding IVM, results showed that most of the oocytes remain arrested at the GV stage at concentrations of 750 and 1000 μM compared with 0 (control), 50 and 100 μM (Figure 3). In addition, there

were no significant differences in the percentage of MI in all treatments (Figure 3). Meanwhile, oocyte maturation (MII) decreased significantly at 750 and 1000 μM compared with 0 (control), 50 and 100 μM .

FIGURE 3 Percentage of oocyte in vitro maturation after MePB exposure. Percentage of porcine oocytes in germinal vesicle, metaphase I and metaphase II after different MePB concentration exposure during in vitro maturation (44 h). Percentage of GV oocytes increased at 750 and 1000 μM compared with 0 (control), 50 and 100 μM . Percentage of MII oocytes decreased at 750 and 1000 μM compared with 0 (control), 50 and 100 μM . Data are presented as mean \pm SD. Significant differences were considered when $P < .05$. *Significant difference vs. control, **significant difference vs. 50 μM MePB, ***significant difference vs. 100 μM MePB. MePB, methylparaben



4 | DISCUSSION

PBs are found in approximately 80% of personal care products (Pouillot, Polla, & Polla, 2006), and approximately 36% of baby products tested (Eriksson, Andersen, & Ledin, 2008). Specifically, MePB is found in 48% of cosmetics and personal care products, so the exposure to this compound is high (Masten, 2005). In women, PBs have been related to decreased ovarian reserve (Smith et al., 2013) and a shortened menstrual cycle (Nishihama et al., 2016), being one of the environmental determinants in fertility impairment. As PBs are considered as EDs (Costa et al., 2014; Giulivo et al., 2016), they can modify blood estrogen levels, resulting in an earlier transition from the follicular to the luteal phase (Nishihama et al., 2016), which may alter the reproductive processes during oogenesis, and thus, oocyte maturation.

In the present study, MePB compromised the integrity of the oocyte cytoplasm. One of the main parameters to determine the quality of an oocyte and its ability to develop is through its nuclear and cytoplasmic maturation (Nevoral et al., 2014). We found that at concentrations of 750 and 1000 μM , MePB altered oocyte cytoplasm, which may compromise the resumption of meiosis II. In this regard, our results are similar to those reported by Meng et al. (2020), where they observed that IBP generated oocyte cytoplasm damage, specifically to the cytoskeleton, causing disturbances in actin microfilaments. It is known that PBs can produce different biological effects, such as inhibition in membrane transport and mitochondrial function (Soniet et al., 2005). Aberrant mitochondrial distribution and lower mitochondrial membrane potential were reported after BuPB exposure, affecting oocyte maturation (Jeong et al., 2020). Mitochondrial bioenergetic activity is a determinant for the developmental competence of oocytes through ATP generation, and the regulation of Ca^{2+} homeostasis, redox state and signal transduction (Dumollard, Carroll, Duchon, Campbell, & Swann, 2009). Therefore, mitochondrial activity

is necessary for oocyte maturation (Russo et al., 2014). A study evaluating the toxic relationship of PBs to mitochondrial membrane permeability found that the transport of these compounds depends on their carbon chain length (Nakagawa & Moldeus, 1998), so that MePB, a low molecular weight molecule, would have a higher permeability in cell membranes and therefore could exert its effect within the oocytes, compromising the maturation resumption process.

In addition, reduced cumulus cell expansion and increased cumulus cell dispersion were observed at 750 and 1000 μM of MePB after 44 hours of IVM. Cumulus cell expansion is required for IVM, and it could be an indicator of oocyte quality in vitro, as the synthesis of hyaluronic acid by these cells is a signal molecule that regulates oocyte maturation (Nevoral et al., 2014). Additionally, cumulus cell-oocyte communication through gap junctions is necessary for meiotic arrest and resumption (Zhou et al., 2016). Studies have shown that cumulus cells are susceptible to toxic agents (Jeong et al., 2020; Meng et al., 2020), because one of their primary functions is to protect oocytes from damage. Cumulus cells surround the oocyte, as they are the first ones to be exposed to several xenotoxic agents (Domínguez et al., 2016). In this case, MePB at concentrations of 750 and 1000 μM , stripped the cumulus cells from the oocytes. Similar results were reported by Meng et al. (2020) at a lower concentration of IBP (400 μM). In addition, Jeong et al. (2020) reported that BuPB decreased cumulus cell expansion at a concentration $>300 \mu\text{M}$. Other toxic agents such as perfluorinated compounds (Domínguez et al., 2016) and bisphenol A (Acuña-Hernández et al., 2018) could inhibit gap junctions and damage granulosa cells, decreasing oocyte maturation whereby PBs could generate similar effects. Therefore, if cumulus cells are affected, IVM might be compromised. In the present study, our results demonstrate that most of the oocytes exposed to MePB remain arrested in GV, reducing MII rates. In addition, it was reported that human granulosa cells exposed to MePB and BuPB did not show changes in steroidogenesis (Herrera-Cogco et al., 2020).

Nevertheless, it is important to consider the differences between granulosa cells with steroidogenic capacity and cumulus cells, which do not possess this function. As PBs are considered EDs, we can hypothesize that, *in vitro*, these compounds could interfere with gonadotropin receptors located in cumulus cells or alter oocyte-cumulus cell gap junctions, decreasing the meiotic resumption mechanism. In future studies, we propose to evaluate the effect that MePB could exert on these receptors as a possible mechanism of damage.

According to the literature, the effect of MePB in porcine oocyte viability and maturation has not yet been reported. In the present study, we found that the concentration at which MePB produced the inhibition of oocyte maturation at 50% was lower than that needed to decrease oocyte viability to 50% ($MIC_{50} = 780.31 \mu\text{M}$; $LC_{50} = 2028.38 \mu\text{M}$), as it takes more than twice as much MIC_{50} to observe a cytotoxic effect. Therefore, our study showed that MePB has low cytotoxicity on oocytes at the concentration ranges assayed. According to Meng et al. (2020), the number of oocytes with apoptosis increased after IBP exposure; however, in another study, the toxic potential of PBs in hepatocytes was evaluated, and they determined that cytotoxicity is proportional to the size of PBs (Nakagawa & Moldeus, 1998). Therefore, the longer the carbon chain of PBs, the more their effect is exacerbated (Andersen, 2008; Soni et al., 2005).

Results showed that most of the oocytes remain arrested in GV at concentrations of 750 and 1000 μM , diminishing their developmental potential. Therefore, the percentage of oocytes reaching the MII stage after MePB exposure decreased significantly at 750 and 1000 μM . In this regard, Meng et al. (2020) reported that at 200 μM of IBP, the first polar body extrusion decreased, and at 400 μM , cumulus cell expansion was affected. This study also provides information indicating that oocyte exposure to IBP induced oxidative stress, apoptosis and cytoplasmic cell damage (Meng et al., 2020). Jeong et al. (2020) reported that BuPB at 300–500 μM impairs oocyte maturation, fertilization, cleavage and blastocyst formation by ROS generation. In addition, BuPB disrupted mitochondrial function and triggered DNA damage, early apoptosis and autophagy in oocytes. According to this, oxidative stress and increased ROS production impair oocyte maturation (Combelles, Gupta, & Agarwal, 2009; Miao, Zhou, Cui, Zhang, & Xiong, 2017). Our results suggest that higher concentrations of MePB (750–1000 μM) are required to affect oocyte maturation compared with those of IBP (200–400 μM) and BuPB (300–500 μM). The adverse effects of PBs appear to increase according to the chain length, wherein IBP and BuPB promote detrimental effects at lower concentrations as compared with MePB.

In other studies in porcine and mouse COCs exposed to different EDs, it was found that they produce the inhibition of cumulus cell expansion, either accelerating the resumption of maturation due to damage in the cumulus cell-oocyte communication or through the inhibition of oocyte maturation due to a disruption in the gap junctions (Acuña-Hernández et al., 2018; Domínguez et al., 2016). Gap junctions between cumulus cells and oocytes are essential for the resumption of meiosis, where binding proteins such as connexins 43, 45 and 60 are essential in species such as pigs, so that any

alterations may lead to the inhibition of maturation (Downs, 2001; Luciano et al., 2005; Tao et al., 2008; Zhou et al., 2016).

Another critical factor for oocyte maturation is the production of an extracellular matrix rich in proteoglycans such as hyaluronic acid, whose importance resides in providing the expansion of cumulus cells and as a molecule that regulates the communication between cumulus cells and the oocytes, participating in meiotic maturation, fertilization and embryo development (Nevoral et al., 2014; Yokoo, Kimura, & Sato, 2010). Any alteration in hyaluronic acid synthesis could compromise these processes. The quantification of the hyaluronic acid, together with the evaluation of GAP junctions, could explain the mechanism by which the cumulus cells lose their adhesion to the oocytes and remain arrested in GV. However, more studies related to PB-induced damage mechanisms *in vitro* are needed.

In the present study, we calculated the MePB LC_{50} and MIC_{50} , which are equivalent to 308.31 and 118.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. We found that the concentrations at which MePB has a negative effect on the viability and IVM of porcine oocytes are higher than those reported in human fluids. The concentrations of toxic agents used in *in vitro* models allow us to understand the mechanism of action of these compounds. As mentioned above, the daily estimated human PBs exposure is calculated at 76 mg. Recently, the fourth NRHEEC in the US population reported the MePB concentrations found in female (72.8 $\mu\text{g}/\text{L}$) and male (31.1 $\mu\text{g}/\text{L}$) urine samples (NRHEEC, 2019). Mínguez-Alarcón et al. (2016) reported that urinary MePB concentration (133 $\mu\text{g}/\text{L}$) was not associated with *in vitro* fertilization outcomes in women undergoing infertility treatments. Nevertheless, Smarr et al. (2017) reported that MePB (31.9 ng/mL) and EtPB (1.09 ng/mL) urine concentrations were associated with a 37% and 33% reduction in couple fecundity, respectively. In this regard, Dodge et al. (2015) reported concentrations of MePB in the urine of people exposed to medications containing PBs. They found that in patients taking fluoxetine, ibuprofen and diphenhydramine, the concentrations of MePB were 104, 213 and 121–1166 ng/mL, respectively. In addition, plasma concentrations of PBs in women were reported, MePB (9.4 ng/mL), EtPB (<3 ng/mL) and PrPB (<2 ng/mL) (Sandanger et al., 2011). In pregnant women, increased levels of PBs were found from the first to the third trimester of pregnancy. Specifically, MePB levels found ranged from 117.84 to 177.21 ng/mg creatinine (Jain, 2016). It has been reported that prenatal exposure to BuPB caused offspring developmental disorders (Ali & Elgoly, 2013). In addition, the detection of MePB, but not the range of concentrations, have been reported in cord blood, breast milk (Makino, 2003) and 75%–93% in follicular fluid (Dimitriadis et al., 2017). Therefore, it would be important to know the concentrations of PBs in follicular fluid to look for its possible association with oocyte maturation and its impact on fertilization.

5 | CONCLUSION

To the best of our knowledge, this is the first study that demonstrates that MePB altered porcine oocyte morphology, and caused a reduction in cumulus cell expansion, both of which resulted in decreased

oocyte maturation. Therefore, MePB exposure may be one of the factors involved in fertility impairment in mammals, including that of humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

CONACYT Scholarship to Adyeni Barrajas-Salinas: 932048. The authors wish to thank the “Los Arcos” slaughterhouse in the State of Mexico for the donation of porcine ovaries.

ORCID

Edmundo Bonilla  <https://orcid.org/0000-0002-7939-4633>

Fahiel Casillas  <https://orcid.org/0000-0002-9916-0586>

REFERENCES

- Acuña-Hernández, D. G., Arreola-Mendoza, L., Santacruz-Márquez, R., García-Zepeda, S. P., Parra-Forero, L. Y., Olivares-Reyes, J. A., & Hernández-Ochoa, I. (2018). Bisphenol A alters oocyte maturation by prematurely closing gap junctions in the cumulus cell-oocyte complex. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 344, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.011>
- Ali, E. H. A., & Elgoly, A. H. M. (2013). Combined prenatal and postnatal butyl paraben exposure produces autism-like symptoms in offspring: comparison with valproic acid autistic model. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 111, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.08.016>
- Andersen, F. A. (2008). Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as Used in Cosmetic Products. *International Journal of Toxicology*, 27, 1–82. <https://doi.org/10.1080/10915810802548359>
- Aubert, N., Ameller, T., & Legrand, J. (2012). Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.045>
- Błądzka, D., Gromadzińska, J., & Wąsowicz, W. (2014). Parabens. From Environmental Studies to Human Health. *Environment International*, 67, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>
- Byford, J., Shaw, L., Drew, M., Pope, G., Sauer, M., & Darbre, P. (2002). Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 49–60. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00174-1)
- Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., & Betancourt, M. (2010). Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 24, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.004>
- Combelles, C. M. H., Gupta, S., & Agarwal, A. (2009). Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive Biomedicine Online*, 18, 864–880. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60038-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60038-7)
- Costa, E., Spritzer, P., Hohl, A., & Bachega, T. (2014). Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 58, 153–161. <https://doi.org/10.1590/0004-273000003031>
- Dimitriadis, I., Mínguez-Alarcón, L., Williams, P., Souter, I., Toth, T. L., Ford, J. B., & Hauser, R. (2017). Follicular fluid (FF) phenol concentration and early in vitro fertilization (IVF) outcomes among women seeking fertility care. *Fertility and Sterility*, 108, e89. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.276>
- Dodge, L., Kelley, K., Williams, P., Williams, M., Hernández-Díaz, S., Missmer, S., & Hauser, R. (2015). Medications as a source of paraben exposure. *Reproductive Toxicology*, 52, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.02.002>
- Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., ... Bonilla, E. (2016). Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 35, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.05.011>
- Downs, S. M. (2001). A gap-junction-mediated signal, rather than an external paracrine factor, predominates during meiotic induction in isolated mouse oocytes. *Zygote*, 9, 71–82. <https://doi.org/10.1017/s0967199401001071>
- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M., & Betancourt, M. (2009). In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 623–633. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9117-3> *Environmental Research* 150: 573–581
- Dumollard, R., Carroll, J., Duchon, M. R., Campbell, K., & Swann, K. (2009). Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.12.013>
- Eriksson, E., Andersen, H., & Ledin, A. (2008). Substance flow analysis of parabens in Denmark complemented with a survey of presence and frequency in various commodities. *Journal of Hazardous Materials*, 156, 240–259. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.022>
- Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E., & Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A Review. *Environmental Research*, 151, 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.011>
- González-Doncel, M., García-Mauriño, J., San, L., Beltrán, E., Sastre, S., & Fernández, C. (2013). Embryonic exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to propylparaben: Effects on early development and post-hatching growth. *Environmental Pollution*, 184, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.022>
- Guo, Y., & Kannan, K. (2013). A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure. *Environmental Science & Technology*, 47, 14442–14449. <https://doi.org/10.1021/es4042034>
- Herrera-Cogco, E., López-Bayghen, B., Hernández-Melchor, D., López-Luna, A., Palafox-Gómez, C., & Ramírez-Martínez, L. (2020). Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29, 1–14. <https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1741052>
- Jain, R. B. (2016). Impact of pregnancy on the levels of parabens and bisphenol A: Data from NHANES 2005-2010. *Journal of Chemistry*, 2016, 1–8, 1529071. <https://doi.org/10.1155/2016/1529071>
- Jeong, P. S., Lee, S., Park, S. H., Kim, M. J., Kang, H. G., Nanjidsuren, T., ... Kim, S. U. (2020). Butylparaben is toxic to porcine oocyte maturation and subsequent embryonic development following in vitro fertilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–13, E3692. <https://doi.org/10.3390/ijms21103692>
- Kim, M. J., Kim, C. H., An, M. J., Lee, J. H., Shin, G. S., Hwang, J., ... Kim, J. W. (2019). Propylparaben induces apoptotic cell death in human placental BeWo cells via cell cycle arrest and enhanced caspase-3 activity. *Molecular & Cellular Toxicology*, 16, 83–92. <https://doi.org/10.1007/s13273-019-00062-9>
- Liao, C., Chen, L., & Kannan, K. (2013). Occurrence of parabens in food-stuffs from China and its implications for human dietary exposure. *Environment International*, 57–58, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.04.001>
- Luciano, A. M., Lodde, V., Beretta, M. S., Colleoni, S., Lauria, A., & Modina, S. (2005). Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3,5-monophosphate, and

- glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, 71, 389–397. <https://doi.org/10.1002/mrd.20304>
- Makino, T. (2003). Female reproductive tract and mammary disorders caused by endocrine disruptor. *Japan Medical Association Journal*, 46, 93–96.
- Masten, S. (2005). Butylparaben review of toxicological literature butylparaben [CAS no. 94-26-8]. *Reviews in Toxicology and Literature*, 1–64.
- Meng, F., Jiao, X., Chen, F., Zhang, X., Duan, Z., Ding, Z., ... Huo, L. (2020). Isobutylparaben negatively affects porcine oocyte maturation through increasing oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61, 433–444. <https://doi.org/10.1002/em.22356>
- Miao, Y. L., Zhou, C., Cui, Z., Zhang, M., & Xiong, B. (2017). Postovulatory aging causes the deterioration of porcine oocytes via induction of oxidative stress. *The FASEB Journal*, 32, 1328–1337. <https://doi.org/10.1096/fj.201700908R>
- Mínguez-Alarcón, L., Chiu, Y.-H., Messerlian, C., Williams, P. L., Sabatini, M. E., Toth, T. L., ... Hauser, R. (2016). Urinary paraben concentration and in vitro fertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Fertility and Sterility*, 105, 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.021>
- Mínguez-Alarcón, L., & Gaskins, A. (2017). Female exposure to endocrine disrupting chemicals and fecundity: a review. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 29, 202–211. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000373>
- Nakagawa, Y., & Moldeus, P. (1998). Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 58, 811–816. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00097-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00097-5)
- National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals, updated tables. (2019). Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention.
- Nevoral, J., Orsák, M., Klein, P., Petr, J., Dvůráková, M., Weingartová, I., ... Jílek, F. (2014). Cumulus cell expansion, its role in oocyte biology and perspectives of measurement: A review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 4, 212–225. <https://doi.org/10.1515/sab-2015-0002>
- Nishihama, Y., Yoshinaga, J., Lida, A., Konishi, S., Imai, H., Yoneyama, M., ... Shirazi, H. (2016). Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan. *Reproductive Toxicology*, 63, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.010>
- Núñez, L., Tadeo, J., García-Valcárcel, A., & Turiel, E. (2008). Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1214, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.105>
- Oishi, S. (2001). Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 17, 31–39. <https://doi.org/10.1191/0748233701th0930a>
- Petters, R. M. (1994). Transgenic livestock as genetic models of human disease. *Reproduction, Fertility, and Development*, 6, 643–645. <https://doi.org/10.1071/rd9940643>
- Pouillot, A., Polla, B., & Polla, A. (2006). Conservateurs en cosmétologie mise au point sur les parabènes. *Journal de Médecine Esthétique et de Chirurgie Dermatologique*, 33, 187–190.
- Russo, R., Monaco, D., Rubessa, M., El-Bahrawy, K. A., El-Sayed, A., Martino, N. A., ... Uranio, M. F. (2014). Confocal fluorescence assessment of bioenergy/redox status of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes before and after in vitro maturation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-16>
- Samarasinghe, S., Krishnan, K., Naidu, R., Megharaj, M., Miller, K., Fraser, B., & Aitken, R. (2018). Parabens generate reactive oxygen species in human spermatozoa. *Andrology*, 6, 532–541. <https://doi.org/10.1111/andr.12499>
- 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. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 21, 595–600. <https://doi.org/10.1038/jes.2011.22>
- Santos, R., Schoevers, E., & Roelen, B. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 26, 112–117. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-117>
- Smarr, M., Sundaram, R., Honda, M., Kannan, K., & Louis, G. M. B. (2017). Urinary concentrations of parabens and other antimicrobial chemicals and their association with couples' fecundity. *Environmental Health Perspectives*, 125, 730–736. <https://doi.org/10.1289/EHP189>
- Smith, K. W., Souter, I., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P. L., Calafat, A. M., & Huaser, R. (2013). Urinary paraben concentrations and ovarian aging among women from a fertility center. *Environmental Health Perspectives*, 121, 1299–1305. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205350>
- Soni, M. G., Carabin, I. G., & Burdock, G. A. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, 43, 985–1015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.020>
- Tao, Y., Cao, C., Zhang, M., Fang, F., Liu, Y., Zhang, Y., ... Zhang, X. (2008). Effects of cumulus cells on rabbit oocyte in vitro maturation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, 438–447. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00729.x>
- Vo, T. T. B., Yoo, Y. M., Choi, K. C., & Jeung, E. B. (2010). Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive Toxicology*, 29, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.01.013>
- Xue, J., & Kannan, K. (2016). Accumulation profiles of parabens and their metabolites in fish, black bear, and birds, including bald eagles and albatrosses. *Environment International*, 94, 546–553. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.015>
- Yang, C., Lim, W., Bazer, F., & Song, G. (2018). Butyl paraben promotes apoptosis in human trophoblast cells through increased oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress. *Environmental Toxicology*, 33, 436–445. <https://doi.org/10.1002/tox.22529>
- Yokoo, M., Kimura, N., & Sato, E. (2010). Introduction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *Journal of Reproduction and Development*, 56, 15–19. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-173e>
- Zhou, C. J., Wu, S. N., Shen, J. P., Wang, D. H., Kong, X. W., Lu, A., ... Liang, C. G. (2016). The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice. *PeerJ*, 4, 1–15, e1761. <https://doi.org/10.7717/peerj.1761>

How to cite this article: Barajas-Salinas A, Ducolomb Y, Betancourt M, et al. Effects of methylparaben on in vitro maturation of porcine oocytes. *J Appl Toxicol*. 2020;1–8. <https://doi.org/10.1002/jat.4045>