



EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

TESI DOCTORAL

2019



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

[Imatge portada: Neumann, I., 1888. Lehrbuch der venerischen Krankheiten und der Syphilis, first ed. Wien, W. Braumüller.]

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

Elga Schreiber Bru

Efectes de l'exposició al n-butilparabèn en el sistema reproductor masculí i l'estrès oxidatiu en testicles de rates joves

TESI DOCTORAL

Dirigida per la Dra. María Mercedes Gómez Arnaiz,
la Dra. Tània Garcia Soldevila i la Dra. Margarita Torrente Torné

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Reus

2019

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "**Efectes de l'exposició al n-butilparabèn en el sistema reproductor masculí i l'estrès oxidatiu en testicles de rates joves**", que presenta Elga Schreiber Bru per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat.

Reus, 22 d'agost del 2019

El/s director/s de la tesi doctoral

Dra. M. Mercedes Gómez Arnaiz

Dra. Tània Garcia Soldevila

Dra. Margarita Torrente Torné

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

**A la família,
especialment al papa i a l'opa**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

AGRAÏMENTS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

En primer lloc, vull agrair a les meves directores tot el temps i esforç dedicat aquests anys. Gràcies Merche, Tània i Marga per ajudar-me i seguir-me.

També vull donar les gràcies al grup TecnaTox, especialment al Dr. Domingo, per l'oportunitat d'entrar al projecte EuroMix i poder veure la grandiositat dels projectes europeus. Especialment vull agrair a la gent de Reus i al Laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental haver-me fet sentir tant a gust. És molt important un ambient agradable i amè i amb vosaltres realment ha estat possible.

A tots aquells que la nostra vida laboral s'ha convertit també en personal: us dono les gràcies per tots els moments i, sobretot, per ser-hi. Paral·lelament, a les persones amb qui no compartim lloc de feina però sí experiències vitals: gràcies per comprendre'm tot aquest temps.

Finalment, no puc oblidar-me de la meua família, de la qual n'estic molt orgullosa. Estem molt units i cada cop queda més palès. Sou un gran reconfort, desitjo que aquesta unió mai s'esvaeixi.

Gràcies a totes i tots, per interessar-vos per aquest treball. Que tot l'esforç d'aquest petit tram de camí condueixi cap a un altre ple de noves experiències.

“Science and everyday life cannot and should not be separated”

Rosalind Elsie Franklin

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

ABREVIATURES	1
RESUM	9
INTRODUCCIÓ	15
1. Disruptors endocrins	17
1.1. Generalitats dels disruptors endocrins	17
1.2. Mecanismes d'acció dels disruptors endocrins	19
1.3. Toxicitat reproductiva generada per l'exposició als disruptors endocrins	20
2. Parabens	22
2.1. Generalitats i ús dels parabens	23
2.1.1. Propietats fisicoquímiques dels parabens	24
2.1.2. Fonts i vies d'exposició dels parabens	24
2.1.3. Metabolització dels parabens	26
2.1.4. Regulació legislativa dels parabens en la Unió Europea	28
2.1.5. Toxicitat dels parabens	29
3. Efectes en el sistema endocrí a causa dels parabens	29
3.1. Efectes estrogènics dels parabens	30
3.2. Efectes antiandrogènics dels parabens	32
4. Efectes dels parabens en el sistema reproductor masculí de rates	33
4.1. Generalitats del sistema reproductor masculí de rates	33
4.1.1. Òrgans sexuals i sexuals accessoris	34
4.1.1.1. Testicles	34
4.1.1.2. Epidídim i conducte eferent	35
4.1.1.3. Òrgans sexuals accessoris	36
4.1.2. Procés d'espermatogènesi	37
4.1.2.1. L'espermatozoide	40
4.2. Alteracions en el sistema reproductor masculí a causa de l'exposició als parabens	41

5. Estrès oxidatiu, sistema reproductor masculí i parabens	43
5.1. Conceptes generals de l'estrès oxidatiu	43
5.1.1. Espècies reactives d'oxigen	44
5.1.2. Sistemes antioxidants	45
5.1.2.1. Sistema enzimàtic	46
5.1.2.2. Sistema no enzimàtic	47
5.2. Estrès oxidatiu en el sistema reproductor masculí	49
5.2.1. Alteracions en el sistema reproductor	50
5.2.2. Sistemes antioxidants en els testicles	52
5.2.3. Sistemes antioxidants en els espermatozoides	53
5.3. Estrès oxidatiu i disruptors endocrins	54
5.3.1. Generació d'estrès oxidatiu a causa de l'exposició als parabens	54
5.3.1.1. Estrès oxidatiu en el sistema reproductor masculí a causa de l'exposició als parabens	56
HIPÒTESI I OBJECTIUS	59
RESULTATS	65
Treball 1: Effects on the reproductive system of young male rats of subcutaneous exposure to n-butylparaben	67
Treball 2: Oxidative stress in testes of rats exposed to n-butylparaben	81
DISCUSSIÓ GENERAL	93
CONCLUSIONS	111
REFERÈNCIES	115
ANNEX	135

ABREVIATURES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

A

ADN: àcid desoxiribonucleic

ATP: adenosina trifosfat

B

BenzP: benzilparabèn

BPA: bisfenol A

BTB: barrera sang-testicle

C

CAT: catalasa

ClO⁻: hipoclorit

C_{max}: concentració màxima

D

DE: disruptor endocrí

pl. **DEs:** disruptors endocrins

DG: dia de gestació

3,4-DHB: àcid 3,4-dihidroxibenzoic

DPN: dia postnatal

E

EO: estrès oxidatiu

ER: estrès reductor

ERN: espècie(-s) reactiva(-es) de nitrogen

ERO: espècie(-s) reactiva(-es) d'oxigen

EtP: etilparabèn

F

FenP: fenilparabèn

FSH: hormona estimulant del fol·licle

G

GnRH: hormona alliberadora de gonadotropina

GPx: glutatió peroxidasa

GR: glutatió reductasa

GSH: glutatió reduït

GSSG: glutatió oxidat

GST: glutatió S-transferasa

H

HDL: lipoproteïnes d'alta densitat

HeptP: heptilparabèn

HF: hipòfisi

HO[•]: radical hidroxil

HO₂[•]: radical hidroperoxil

H₂O: aigua

H₂O₂: peròxid d'hidrogen

17β-HSD: 17β-hidroxiesteroid deshidrogenasa

HT: hipotàlem

HT-HF: hipotàlem-hipofisari

HT-HF-G: hipotàlem-hipofisari-gonadal

I

iButP: isobutilparabèn

IDA: ingesta diària admissible

iProP: isopropilparabèn

J

JECFA: Joint Expert Committee on Food Additives

L

L[•]: radical lipídic

LDL: lipoproteïnes de baixa densitat

LH: hormona luteïnitzant

LOO[•]: radical lipoperòxid

LOOH: lipohidroperòxid

M

MetP: metilparabèn

N

NADH: nicotinamida adenina dinucleòtid

NADPH: nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat

n-ButP: n-butilparabèn

NO: òxid nítric

n-ProP: n-propilparabèn

O

$^1\text{O}_2$: singlet d'oxigen

O_2 : oxigen

$\text{O}_2^{\bullet-}$: anió superòxid

O_3 : ozó

OctP: octilparabèn

OH-EtP: etil-3,4-dihidroxibenzoat

OH-MetP: metil-3,4-dihidroxibenzoat

OMS: Organització Mundial de la Salut

ONOO $^-$: peroxinitrit

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

P

PBPK: model farmacocinètic basat en fisiologia

PBs: parabens

PCB: bifenils policlorats

PDHC: compostos disruptors de la homeòstasi fisiològica

PenP: pentilparabèn

PHBA: àcid *p*-hidroxibenzoic

PHHA: àcid *p*-hidroxihippúric

PON1: paraoxonasa 1

R

RA: receptors d'andrògens

RE: receptors d'estrògens

RG o **RGC:** receptors de glucocorticoides

RLL: radical(-s) lliure(-s)

RM o **RMC:** receptors de mineralocorticoides

RO•: radical alcoxil

ROO•: radical peroxil

RP: receptors de progesterona

S

SCCS: Scientific Committee on Consumer Safety

SOD: superòxid-dismutasa

SULT: sulfotransferasa

pl. **SULTs:** sulfotransferases

T

TAG: triacilglicèrids

TBARS: espècies reactives a l'àcid tiobarbitúric

U

UDP: difosfat d'uridina

UE: Unió Europea

UGT: UDP-glucuronosiltransferases

UV: ultraviolats

V

Vit: Vitamina

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

RESUM

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

Els disruptors endocrins (DEs) es defineixen com a compostos exògens, tant naturals com sintètics, que alteren el sistema endocrí i, consegüentment, causen efectes adversos en la salut d'un organisme sa o a la seva progènie o a (sub)poblacions (WHO/IPCS, 2002). Són un grup de compostos molt heterogeni que es poden classificar segons el seu origen o el seu ús (Nohynek et al., 2013; Sidorkiewicz et al., 2017). A conseqüència de la gran varietat de DEs, els efectes generats en l'organisme són molt diversos: en el sistema reproductor i en el desenvolupament, en la glàndula tiroïdes i les hormones tiroïdals, en l'hormona insulina i la diabetis, en el sistema nerviós, relacionats amb el càncer, problemes d'obesitat, problemes en el metabolisme, problemes cardiovasculars, entre molts altres (Maqbool et al., 2016).

Els parabens (PBs) són compostos químics exògens als éssers humans d'origen natural o sintètic i són classificats com a DEs. L'estructura molecular està formada per l'àcid *p*-hidroxibenzoic (*p-hydroxybenzoic acid*, PHBA) i una cadena de tipus alquil esterificada. La cadena alquil pot ser lineal, ramificada o aromàtica. Els PBs poden presentar altres modificacions com hidroxilacions en l'anell benzènic. S'utilitzen en una gran varietat de productes, en què la font principal en els éssers humans són els productes d'higiene personal i cosmètics. Es fan servir com a preservatius gràcies a l'activitat bactericida i fungicida d'ampli espectre, el cost econòmic de producció baix i la toxicitat baixa en humans. No obstant això, cada vegada tenen més interès social a causa d'estudis que mostren efectes estrogènics i antiandrogènics per part dels PBs, així com la suposada relació amb el càncer de mama o amb al·lèrgies, especialment a la dermis (Boberg et al., 2016; Harvey i Darbre, 2004; Routledge et al., 1998). Els PBs més utilitzats són el metil- (MetP), etil- (EtP), n-propil- (n-ProP) i n-butilparabèn (n-ButP) i el n-ButP és qui té més potencial estrogènic respecte als altres PBs.

Els parabens són absorbits i metabolitzats ràpidament per esterases de la pell en PHBA i àcid *p*-hidroxihíppúric (*p-hydroxyhippuric acid*, PHHA), que són dos dels principals catabòlits. Els PBs de cadena llarga són hidrolitzats de manera menys eficient per les esterases de la pell, de tal manera que tenen una vida mitjana més gran en l'organisme respecte als PBs de cadena curta. Els dos catabòlits i la resta de PBs no-hidrolitzats són eliminats completament, principalment per l'orina, al cap de 48 hores (Abbas et al., 2010).

Els parabens afecten a múltiples dianes relacionades amb el potencial endocrí i, consegüentment, generen efectes adversos en diversos òrgans endocrins (com en les glàndules adrenals, en el pàncrees o en la tiroïdes), així com en el fetge (com a òrgan detoxificador de xenobiòtics) o en la

pell (com a via d'exposició principal als PBs) (Nowak et al., 2018). En els diversos òrgans, interactuen amb els receptors d'estrògens o receptors d'andrògens i generen efectes estrogènics o antiandrogènics. Estudis *in vitro* han descrit que els PBs tenen una afinitat i eficàcia baixa amb els receptors d'estrògens; així doncs, el seu potencial estrogènic va de 10.000 (n-ButP), 30.000 (n-ProP), 150.000 (EtP) a 2.500.000 (MetP) vegades menys respecte del 17 β -estradiol (Routledge et al., 1998). Per aquest motiu són classificats com a DEs febles. Cal destacar que el potencial estrogènic canvia segons la cadena alquil i s'incrementa com més gran és la cadena alquil. A més, certs estudis *in vivo* han vist que els PBs subministrats per via subcutània tenen més potencial estrogènic que quan són subministrats per via oral. Hi ha un gran nombre d'estudis *in vivo* que mostren alteracions en el sistema reproductor, tant de mascles com de femelles, a causa dels PBs (Kang et al., 2002; Oishi, 2001; Vo et al., 2010). Referent al sistema reproductor masculí, les principals alteracions observades a causa de l'exposició als PBs són reducció de la qualitat espermàtica i alteracions des del punt de vista hormonal i histològic. Addicionalment, s'ha observat com els PBs de cadena alquil llarga (n-ProP, n-ButP i les seves respectives isoformes) causen més efectes adversos que els PBs de cadena alquil curta.

Des de fa temps es coneix la relació entre l'exposició als DEs i l'augment de l'estrès oxidatiu (EO), així com la relació entre l'EO i problemes de fertilitat. Per aquest motiu, diversos autors han estudiat la relació entre els PBs i l'EO. S'ha observat com l'exposició als PBs pot generar EO en diverses espècies (Brown et al., 2018; Shah i Verma, 2011; Silva et al., 2018), així com en l'aparell reproductor masculí de rates (Riad et al., 2018). No obstant això, els estudis d'EO en l'aparell reproductor masculí són limitats. La majoria d'estudis observa l'increment de l'EO per l'exposició als PBs, però diversos autors suggereixen efecte antioxidant per part dels PBs i/o els seus catabòlits (Kopalli et al., 2013; Popa et al., 2014). Cal, doncs, realitzar més estudis en aquest àmbit per poder establir de manera més acurada els mecanismes oxidants i antioxidants per part dels PBs.

Com a conseqüència de la preocupació social creixent envers a l'ús dels PBs i els seus efectes estrogènics, s'ha detectat la necessitat de realitzar nous estudis toxicològics. Se sap que la principal font d'exposició és per la pell i hi ha pocs estudis on la via d'administració és subcutània. Aquesta tesi doctoral vol aportar noves dades toxicològiques envers la via d'administració subcutània. A més, la gran majoria d'estudis toxicològics dels PBs en l'àmbit reproductiu són en femelles o femelles embarassades de rosegadors. No obstant això, els PBs també tenen capacitat disruptora en el sistema reproductor masculí. Per aquests motius, en aquesta tesi doctoral es tractaran

subcutàniament mascles joves de rata amb n-ButP. El n-ButP és el compost escollit a causa de la seva utilització en productes farmacèutics, així com en productes d'higiene personal i cosmètics o en aliments, i pel potencial estrogènic que té, el qual és més gran respecte a la resta de PBs permesos amb cadena alquil lineal.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és determinar si el n-ButP administrat subcutàniament en rates mascle joves durant un cicle sencer d'espermatogènesi pot generar efectes tòxics en el sistema reproductor masculí, així com alterar els paràmetres espermàtics. A més, a causa de la relació coneguda entre l'exposició als DEs i l'augment d'EO que pot afectar la fertilitat, es vol determinar si el n-ButP pot causar EO en els testicles i, consegüentment, alterar els paràmetres reproductors i a la fertilitat.

Es van tractar subcutàniament rates mascle joves de 45 dies d'edat 3 dies alterns per setmana durant un cicle sencer d'espermatogènesi (57 dies) amb n-ButP a tres dosis diferents: 150, 300 i 600 mg/kg/d. També es van realitzar dos controls: amb vehicle (oli de cacauet) i sense vehicle.

En el treball 1 es vol determinar si el n-ButP pot afectar el sistema reproductor i als paràmetres espermàtics. Per estudiar els efectes del n-ButP, es van analitzar els paràmetres espermàtics de mobilitat, viabilitat, morfologia, maduresa i recompte d'espermatozoides i d'espermàtides resistents a la homogeneïtzació, així com la histopatologia dels òrgans sexuals i sexuals accessoris. En aquest treball també es van estudiar els efectes des del punt de vista bioquímic i hormonal. Els resultats mostren que el n-ButP provoca l'augment significatiu de la morfologia anormal dels espermatozoides, especialment del cap, així com alteracions en la histopatologia dels testicles i la vesícula seminal. A més, el n-ButP provoca l'increment del pes relatiu de la pròstata a causa de la seva capacitat disruptora del sistema endocrí. Aquests resultats indiquen que l'exposició subcutània del n-ButP indueix efectes tòxics en el sistema reproductor que podrien afectar la capacitat de fertilització dels animals.

En el treball 2 es vol determinar si té lloc un estat d'EO en els testicles de rata a causa del n-ButP. Es van analitzar la concentració de peròxids (d'hidrogen i lipídics), així com l'activitat i l'expressió proteica dels principals enzims implicats en el sistema antioxidant. Alternativament, es va determinar la concentració dels elements traça per poder relacionar-los amb les possibles alteracions reproductives i amb l'EO. Finalment, es va dissenyar del model farmacocinètic basat en fisiologia (*Physiologically-based pharmacokinetic*, PBPK) per mostrar els perfils de temps-

concentració del n-ButP a les dosis donades en els testicles i el plasma. Els resultats mostren l'increment de l'EO a causa del vehicle (oli de cacauet) excepte en la dosi més alta (600 mg/kg/d). Suggestim un possible efecte antioxidant a causa del n-ButP i els seus catabòlits a la dosi més alta, ja que és l'únic grup que no mostra EO. A més, es va analitzar la concentració de metalls en el testicle i el Ca és l'únic element traça que es veu afectat a causa de l'exposició al vehicle. Els resultats indiquen que l'oli de cacauet pot causar EO, mentre que les dosis altes de n-ButP poden actuar com agent antioxidant en els testicles. El model PBPK descriu com la concentració màxima (C_{max}) en testicles es troba lleugerament superior a la del plasma a causa del volum, el flux sanguini i el coeficient de partició del testicle. Finalment, la concentració del n-ButP en testicle i plasma és molt més petita que la concentració subministrada subcutàniament.

Com a conclusió general del treball presentat s'ha obtingut que el n-ButP és absorbit via subcutània i actua com a disruptor endocrí en els mascles joves de rata, provoca alteracions en l'àmbit espermàtic, especialment en la morfologia, i en la histopatologia dels testicles i la vesícula seminal, alteracions que podrien estar relacionades amb la infertilitat. No obstant això, el n-ButP no provoca EO als testicles, estrès que és generat per l'exposició a l'oli de cacauet, fet que ens suggereix que el control específic del vehicle és necessari en estudis *in vivo*. Addicionalment, el n-ButP i els seus catabòlits generen efecte antioxidant en la dosi alta.

INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

1. Disruptors endocrins

El terme disruptor endocrí (DE) cada vegada va guanyant més popularitat en la societat actual, ja que està associat a problemes de salut. Es defineix (WHO/IPCS, 2002) com a:

Compost exogen, tant natural com sintètic, que altera el sistema endocrí i, consegüentment, causa efectes adversos en la salut d'un organisme sa o en la seva progènie o (sub)poblacions.

Des de fa més de 25 anys s'ha identificat un gran nombre de compostos químics que s'engloben en la definició de DE (Barouki, 2017; Monneret, 2017).

Els disruptors endocrins (DEs) no són els únics compostos exògens capaços de causar alteracions en l'organisme. Actualment, s'han definit també els compostos similars als DEs (*EDC-like compounds*), els quals provoquen alteracions en l'organisme sense necessitat d'actuar sobre el sistema endocrí. No obstant això, és més correcte parlar de *compostos disruptors de la homeòstasi fisiològica* (*Physiological Homeostasis Disrupting Compounds*, PDHC), terme que engloba els compostos exògens capaços de provocar alteracions en l'organisme, ja sigui des del punt de vista endocrí (DEs) o no (compostos similars als DEs) (Barouki, 2017).

1.1. Generalitats dels disruptors endocrins

Els disruptors endocrins són molt heterogenis i es poden classificar segons si el seu origen és natural o sintètic. També es poden agrupar segons el seu ús: *solvents industrials* (dioxines, bifenils policlorats (PCB)), *plàstics* (bisfenols o alquilfenols), *plastificants* (ftalats), *pesticides* (metoxiclor), *fungicides* (vinclozolin), *agents farmacèutics* (dietilestilbestrol), entre d'altres (Nohynek et al., 2013; Sidorkiewicz et al., 2017).

Considerant les característiques estructurals dels DEs, és molt difícil establir relacions entre si. Això és a causa dels diversos mecanismes d'acció del DEs en l'organisme i de la gran varietat de compostos existents. A més, algunes vegades els metabòlits d'un DE són més perjudicials que el mateix DE. No obstant això, els investigadors han trobat similituds en les estructures moleculars dels DEs per establir si un compost pot actuar via disrupció endocrina o no. Malgrat tot, és important ressaltar que el coneixement de l'estructura molecular no està relacionat necessàriament amb el coneixement del potencial endocrí d'un determinat DE.

És important destacar que els efectes adversos en un organisme canvien segons el DE que actui. Algunes de les característiques que cal tenir en compte a l'hora d'avaluar el potencial endocrí són les següents (Barouki, 2017; Combarous, 2017; Kabir et al., 2015):

1. La **concentració** del DE. L'exposició als DEs es dona per múltiples fonts, i segons la concentració poden ocasionar més o menys efectes adversos sobre els organismes exposats.
2. L'**efecte** de la **dosi baixa**. La corba dosi-resposta pot no respondre al patró segons el qual com més dosi del compost, més resposta o efecte advers en l'organisme s'espera. Addicionalment, s'ha vist com dosis molt baixes en l'organisme poden generar efectes adversos, ja que a part de la dosi, cal tenir en compte altres paràmetres com l'edat de l'organisme, la via d'exposició i el temps i la presència d'altres DEs, entre altres.
3. El **temps** d'exposició. La durada de l'exposició és important a l'hora de determinar-ne els possibles efectes adversos. A més, tots els DEs que l'organisme no és capaç de metabolitzar i eliminar es poden bioacumular i poden esdevenir exposicions internes de contaminació.
4. L'**edat** del **organisme** que entra en contacte amb el DE. Els organismes en desenvolupament o els infants són molt més susceptibles al DE que un organisme adult. L'exposició a un DE en edats molt primerenques (fetus o infant) pot desencadenar fàcilment més problemes en l'organisme adult.
5. La **via d'exposició** al DE pot ser per via oral, per mitjà del menjar o aigua; per via dèrmica; per inhalació; per via intravenosa, o per transferència biològica (per la placenta o la llet materna). A més, l'exposició als DEs pot generar efectes adversos latents que es manifesten al cap del temps, per exemple en l'edat adulta o en la vellesa.
6. La **vulnerabilitat** de l'**òrgan** o **teixit**. No tots els òrgans o teixits d'un mateix organisme són afectats de la mateixa manera per un mateix DE en les mateixes condicions de dosi i temps d'exposició. Quan s'observen els efectes adversos generats per l'exposició d'un determinat DE, el primer òrgan a mostrar-los és el més vulnerable i rep el nom d'*òrgan diana*.
7. Altres conceptes que cal tenir presents són l'**absorció**, la **metabolització** i l'**excreció** del DE, així com la **vida mitjana** i la **persistència** en l'ambient.

D'altra banda, és interessant destacar que cada vegada més s'observen efectes additius o de sinergisme entre dos o més compostos químics. En la nostra societat, ja no es pot entendre

l'exposició a un DE per si sol, ja que estem en contacte permanent amb múltiples DEs. Per aquest motiu, les mescles de contaminants químics actualment prenen més importància. Per això, avui dia hi ha la necessitat d'augmentar el nombre d'estudis que avaluin els efectes adversos de mescles de contaminants i el nombre d'eines que en facilitin l'anàlisi de dades.

1.2. Mecanismes d'acció dels disruptors endocrins

Per entendre com actuen els DEs, s'ha de tenir ben clar el concepte de *sistema endocrí*. El sistema endocrí està format per un conjunt d'òrgans i teixits especialitzats en la secreció de les hormones, per regular diversos processos de l'organisme. Hi ha aproximadament unes 50 hormones o molècules relacionades amb les hormones que regulen diversos processos biològics. Els DEs mimetitzen l'acció de les hormones. Les hormones presenten una gran afinitat pels seus receptors hormonals específics. El problema arriba quan els DEs presenten afinitat per aquests mateixos receptors, o per les proteïnes associades als receptors o a les diverses proteïnes associades a les vies de senyalització i, consegüentment, es poden unir en qualsevol. Els DEs poden actuar per diferents vies sobre el sistema endocrí. Destaquem les quatre següents (Combarrous, 2017), malgrat que hi poden haver múltiples mecanismes d'acció més:

- El DE interacciona amb el receptor hormonal, l'estimula i genera sobrerregulació. Alternativament, el DE pot interaccionar amb el receptor hormonal i inhibir-lo, la qual cosa genera subregulació.
- El DE genera estimulació o inhibició sobre la biosíntesi de l'hormona.
- El DE genera estimulació o inhibició de la degradació de l'hormona.
- El DE produeix estimulació o degradació de la proteïna d'unió a l'hormona, fet que provoca el descens o l'increment de la biodisponibilitat de l'hormona circulant, respectivament.

Tots aquests mecanismes d'acció poden interferir i afectar les vies de senyalització dels diversos receptors, per exemple, els receptors d'estrògens (RE), els receptors d'andrògens (RA), els receptors de progesterona (RP), els receptors de glucocorticoides (RG o RGC), o els receptors de mineralocorticoides (RM o RMC), entre d'altres. D'altra banda, també poden interferir i afectar l'esteroidogènesi, entre molts altres processos on hi hagi regulació endocrina (Giulivo et al., 2016; Sidorkiewicz et al., 2017).

Com a conseqüència de la gran varietat de DEs i els múltiples mecanismes d'acció, els efectes generats en l'organisme són diversos. Es poden trobar efectes adversos en el sistema reproductor i

en el desenvolupament, com poden ser anormalitats en els testicles o els ovaris, o una qualitat espermàtica baixa, entre altres de relacions amb malalties o síndromes reproductives. També es pot trobar un increment de la incidència de càncer en diversos òrgans, sobretot en els sensibles a la regulació hormonal. Altres efectes adversos que podem trobar a causa dels DEs poden ser efectes en la glàndula tiroïdes i les hormones tiroïdals, en l'hormona insulina i la diabetis, problemes d'obesitat, problemes en el metabolisme, problemes cardiovasculars, efectes en el sistema nerviós, entre molts altres (Maqbool et al., 2016).

1.3. Toxicitat reproductiva generada per l'exposició als disruptors endocrins

La infertilitat s'ha convertit en un dels problemes actuals més grans en el primer món. S'ha calculat que fins a un 15% de les parelles no són capaces de concebre després d'un any d'intents. A més, en un 20% de les parelles la principal causa d'infertilitat ve de l'home, i fins en un 30-40% de les parelles, els homes participen en els problemes de fertilitat juntament amb les dones (Practice Committee ASRM, 2015). Aquest augment de la infertilitat en els homes pot ser per problemes en el transport dels espermatozoides, en els testicles, en els nivells hormonals i en l'eix hipotàlem-hipofisari (HT-HF) o, fins i tot, per causes desconegudes. Altres factors com l'abús de l'alcohol o el tabac, l'obesitat, l'estrès, la presència d'infeccions, alteracions metabòliques, alguns fàrmacs, les radiacions o l'exposició a compostos químics exògens, en els quals es troben els DEs, també poden reduir la qualitat dels espermatozoides. Respecte a les dones, l'augment de la infertilitat pot ser deguda a la síndrome d'ovaris poliquístics, a lesions en la trompa de Fal·lopi, al fet de tenir endometriosis, o a l'edat avançada de la dona que vol quedar-se embarassada (NICHD, 2019 [accés el 24/05/2019]).

Entre les múltiples causes de l'augment de la infertilitat, s'ha observat la relació entre la infertilitat i els DEs, ja que aquests compostos tenen la capacitat d'alterar el sistema endocrí i generar un efecte advers sobre el sistema reproductor (Zamkowska et al., 2018). S'anomena *toxicitat reproductiva* el conjunt d'alteracions en el sistema reproductor a causa de l'acció d'un compost químic exogen. La toxicitat reproductiva es presenta tant en homes com en dones i pot ser prenatal o postnatal. Generalment, l'exposició prenatal s'associa a problemes de desenvolupament i maduració o defectes en el naixement. Si, al contrari, l'exposició té lloc postnatalment, els efectes s'associen a problemes de fertilitat o alteracions en l'espermatogènesi en els homes i en l'ovogènesi en les dones. Finalment, també hi pot haver efectes tòxics des del punt de vista genètic en els gàmetes, de tal manera que les mutacions són heretades per la progènie.

Els disruptors endocrins, tant en homes com en dones, poden actuar sobre l'eix HT-HF, el qual és l'encarregat de secretar l'hormona luteïnitzant (*luteinizing hormone*, LH) i l'hormona estimulant del fol·licle (*follicle-stimulating hormone*, FSH), que actuen directament sobre les gònades i provoquen els processos d'espermatogènesi o ovogènesi. També poden afectar els eixos hipotàlem-adrenal o hipotàlem-tiroidal i alterar la receptivitat de l'endometri o provocar envelliment biològic, i disminuir la fertilitat. D'altra banda, en els homes adults, els DEs poden actuar directament sobre els testicles o altres òrgans sexuals i generar una possible pèrdua de qualitat espermàtica o del mateix procés d'espermatogènesi. A l'últim, en les dones, els DEs poden afectar els ovaris, ja sigui alterant-ne l'ovulació o la qualitat dels oòcits. Totes aquestes alteracions, tant en homes com en dones, generen l'augment de la infertilitat en les parelles (figura 1) (Hipwell et al., 2019). A mode d'exemple, les dioxines redueixen la concentració de testosterona en testicle i sèrum i la mobilitat espermàtica (Comhaire et al., 2007); els ftalats estan relacionats amb problemes de concentració, mobilitat i morfologia espermàtica (Duty et al., 2003); o el dietilestilbestrol s'ha relacionat amb avortaments o amb l'increment del criptorquidisme i les hipospàdies, així com amb la reducció de la qualitat espermàtica (Sharpe i Skakkebaek, 1993).

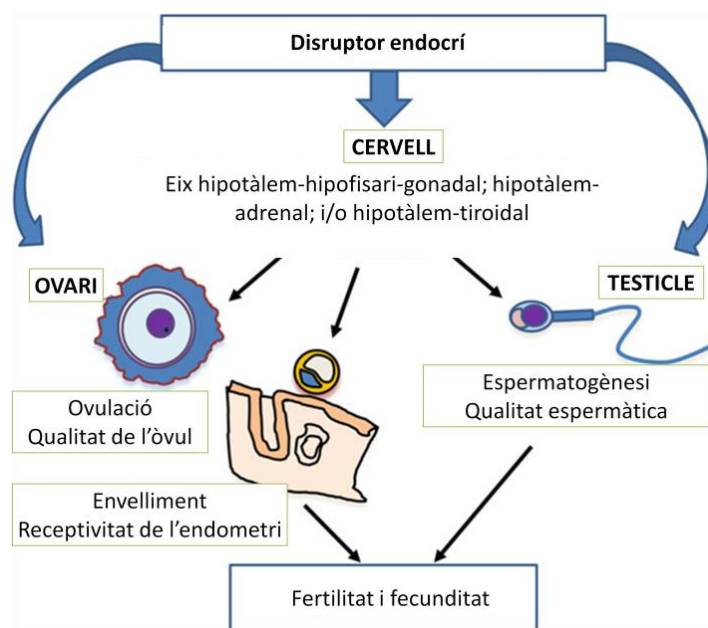


Figura 1. Efectes dels disruptors endocrins relacionats amb la toxicitat reproductiva. Imatge adaptada (Hipwell et al., 2019).

2. Parabens

Els parabens (PBs) són com popularment es coneixen els èsters de l'àcid *p*-hidroxibenzoic (*p*-hydroxybenzoic acid o PHBA). Són substàncies químiques exògenes als éssers humans d'origen natural o sintètic. S'usen com a preservatius en una gran quantitat de productes gràcies a les seves activitats fungicides i bactericides d'ampli espectre i el baix cost econòmic de producció.

L'estructura molecular dels PBs està formada per l'àcid *p*-hidroxibenzoic i una cadena de tipus alquil esterificada. La cadena alquil és la que canvia entre els diversos PBs i, consegüentment, la que els permet diferenciar entre si i que els anomena. Els PBs més coneguts presenten una cadena alquil lineal o ramificada en la qual destaquen els radicals següents: metil- (metilparabèn, MetP); etil- (etilparabèn, EtP); propil- (n-propilparabèn, n-ProP); isopropil- (isopropilparabèn, iProP); butil- (n-butilparabèn, n-ButP); isobutil- (isobutilparabèn, iButP) (figura 2). La cadena alquil també pot ser un anell aromàtic en el qual trobem els radicals benzil- (benzilparabèn, BenzP) o fenil- (fenilparabèn, FenP) (Błędzka et al., 2014) (figura 2).

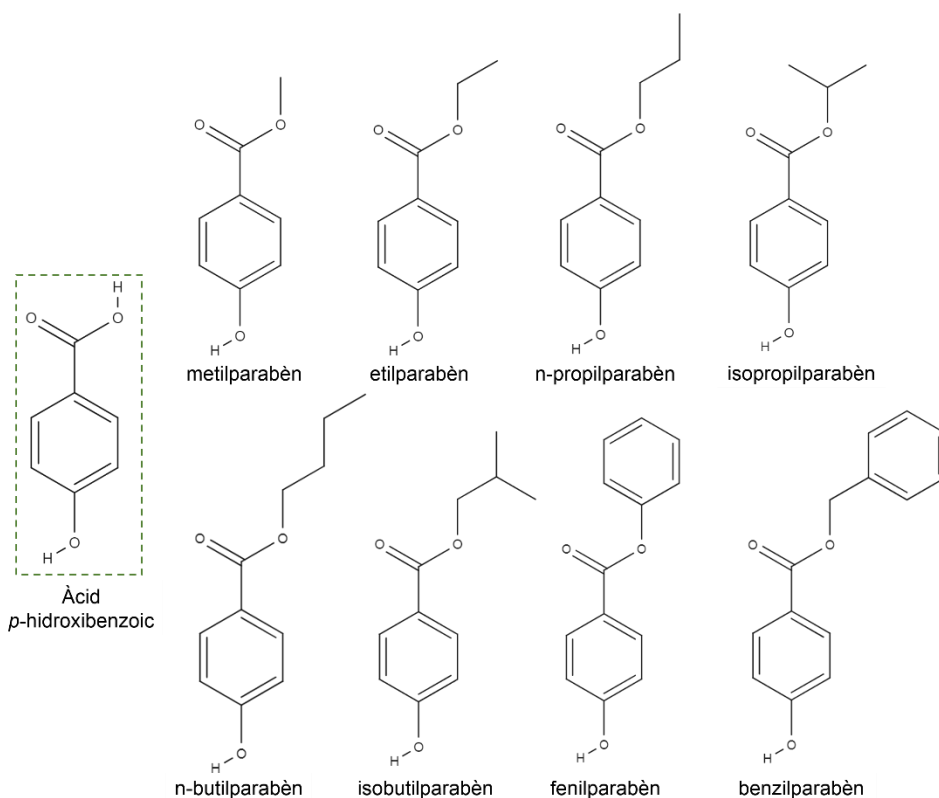


Figura 2. Estructura molecular de l'àcid *p*-hidroxibenzoic i dels èsters de l'àcid *p*-hidroxibenzoic (parabens) més comuns.

Hi ha molts altres PBs segons la cadena alquil que presenten o fins i tot altres modificacions en l'anell benzènic, com es pot veure en la taula 1 a mode d'exemple. Concretament, s'han identificat 35 PBs diferents (Fransway et al., 2019a).

Taula 1. Exemples de varis parabens agrupats segons la naturalesa de la cadena alquil o modificacions en l'anell benzènic. Taula adaptada (Fransway et al., 2019a; Hipwell et al., 2019).

Cadena lineal	Cadena ramificada	Cadena aromàtica	Modificacions anell benzènic
Metilparabèn (MetP)			Metil-3,4-dihidroxibenzoat
Etilparabèn (EtP)		Benzilparabèn	(OH-MetP)
n-Propilparabèn (n-ProP)	Isopropilparabèn (iProP)	(BenzP)	Etil-3,4- dihidroxibenzoat
n-Butilparabèn (n-ButP)	Isobutilparabèn (iButP)	Fenilparabèn	(OH-EtP)
Pentilparabèn (PenP)		(FenP)	Àcid 3,4-dihidroxibenzoic
Heptilparabèn (HeptP)			(3,4-DHB)
Octilparabèn (OctP)			

2.1. Generalitats i ús dels parabens

Els parabens són àmpliament usats des de la dècada del 1920 com a preservatius en molts productes (Liebert, 1984), com ara cosmètics o productes d'higiene personal, aliments o productes farmacèutics (Błędzka et al., 2014; FDA, 2016).

Presenten una capacitat antifúngica i antibacteriana, especialment contra els bacteris gram positius, d'ampli espectre. El seu mecanisme d'acció afecta els processos de transport de la membrana mitocondrial. Específicament, s'altera la permeabilitat de la membrana i, com a conseqüència, hi ha una despolarització d'aquesta membrana i una depleció de l'ATP. Aquesta depleció de l'ATP provoca la inhibició del creixement microbià o dels fongs (Soni et al., 2001). Cal destacar que les propietats fungicides i bactericides s'incrementen com més gran és la cadena alquil (Błędzka et al., 2014), malgrat que l'augment d'aquesta cadena fa disminuir la solubilitat en aigua del compost (Soni et al., 2005). Com a conseqüència, i per arribar a una bona capacitat preservativa per part dels PBs, moltes vegades els productes d'ús humà als quals estem exposats presenten mesclades de PBs. A més, tenen un cost econòmic de producció baix i pocs efectes adversos a la salut humana, la qual cosa els fa relativament segurs (Soni et al., 2001).

El 2004 Harvey i Darbre van detectar PBs en mostres de càncer de mama i van relacionar l'ús de desodorants amb l'increment del risc a patir aquest tipus de càncer. Malgrat que encara hi ha certs buits experimentals, aquest va ser un dels punts principals que va generar preocupació per l'ús

excessiu dels PBs en productes d'ús diari o quotidià i la seva possible relació amb efectes estrogènics, antiandrogènics o amb el càncer de mama. Cal destacar també que s'han trobat PBs en una gran varietat de productes destinats a infants. Aquesta situació va fer incrementar l'interès pels PBs per part de la societat i, consegüentment, l'augment del nombre d'estudis (Boberg et al., 2016; Byford et al., 2002; Chen et al., 2007; Guerra et al., 2017; Hoberman et al., 2008; Kjaerstad et al., 2010; Lemini et al., 2003; Oishi, 2004, 2001; Routledge et al., 1998; Satoh et al., 2005; Vo et al., 2010).

Els parabens comunament més usats són el MetP i el n-ProP seguits per l'EtP i el n-ButP. Es poden usar de forma individual, tot i que generalment s'utilitzen en combinacions entre si o amb algun altre biocida (Fransway et al., 2019a).

A part de les seves propietats biològiques (ampli espectre antifúngic i antibacterià) i econòmiques (síntesi i producció molt econòmica i en grans quantitats), les propietats fisicoquímiques dels PBs els acaben de donar interès.

2.1.1. Propietats fisicoquímiques dels parabens

Primerament, són sòlids de color blanc a temperatura ambient, no volàtils i inerts que presenten una gran estabilitat química en un rang de temperatura i pH (4,5 a 7,5). Tenen un cert nivell de solubilitat en solucions aquoses, malgrat que com més gran és la cadena alquil, la solubilitat en aigua disminueix. Generalment, els PBs són estables en solucions aquoses àcides, mentre que en solucions aquoses alcalines s'hidrolitzen en PHBA i l'alcohol corresponent. La resistència a la hidròlisi en medi aquós augmenta a mesura que la cadena alquil s'allarga (Błędzka et al., 2014).

Respecte a les característiques organolèptiques, no presenten ni olor ni gust, malgrat que les concentracions superiors al 0,08% de PBs s'associen a un gust metàl·lic fort (Fransway et al., 2019a). Finalment, la seva addició no presenta canvis de coloració en els productes (Błędzka et al., 2014).

2.1.2. Fonts i vies d'exposició dels parabens

Els parabens poden presentar un origen natural o sintètic. A la natura existeixen organismes capaços de generar-los de manera natural com poden ser algunes plantes herbàcies (Bais et al., 2003) o bacteris marins (Peng et al., 2006). També es troben en determinades fruites com els nabius, les mores o les fruites de la passió, entre altres (Nowak et al., 2018). No obstant això, els

PBs d'origen sintètic són la principal font d'exposició per als humans. Conseqüentment, a causa de les diverses fonts d'origen i el gran ús dels PBs en diversos productes, hi ha múltiples vies d'exposició per als humans (figura 3).

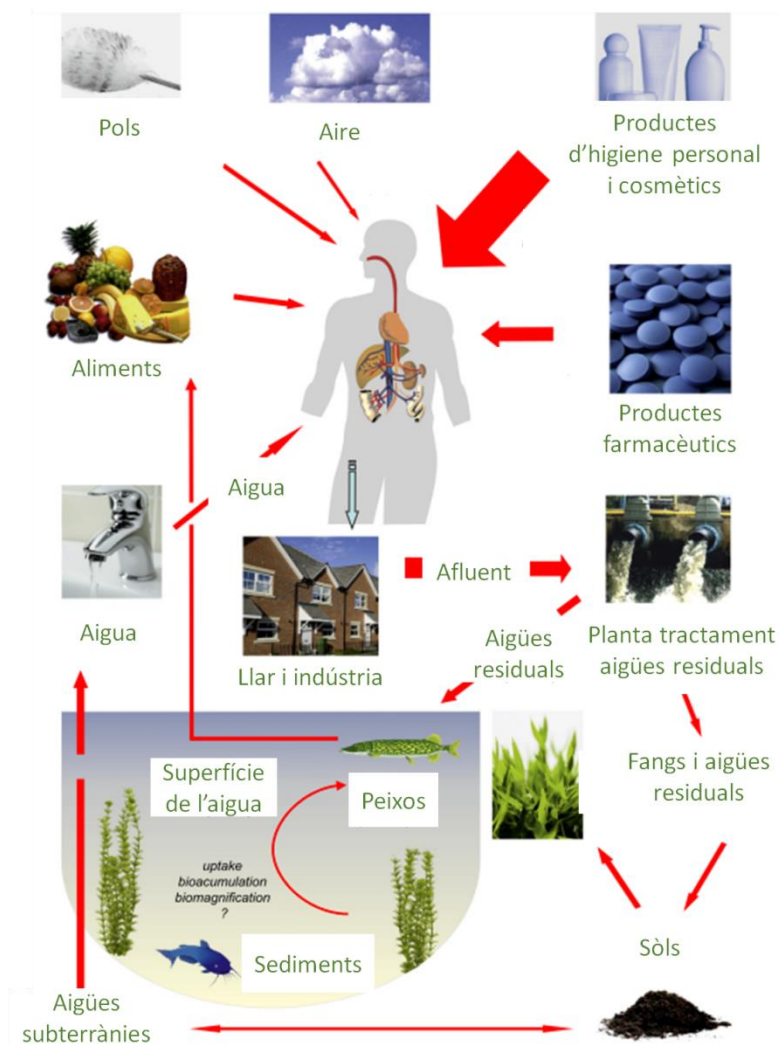


Figura 3. Fonts i vies d'exposició dels parabenos. Imatge adaptada (Błedzka et al., 2014).

L'exposició als PBs pot ser per contacte dèrmic o per ingesta, essencialment. No obstant això, també hi ha exposició a través de la inhalació. Relacionats amb l'ús de productes, els d'higiene personal i cosmètics en són la font principal, en què el MetP i el n-ProP són els PBs més usats (Nowak et al., 2018). Pel que fa al menjar i als productes farmacèutics, contribueixen a l'exposició en menor mesura i el MetP, seguit del n-ProP, és un dels PBs amb més presència (Nowak et al., 2018). Respecte de l'ambient, podem trobar PBs en l'aigua, sòls i sediments a causa del tractament

d'aigües residuals contaminades o per la mateixa deposició dels PBs presents a l'atmosfera (Błedzka et al., 2014); en organismes que han entrat en contacte amb els PBs de l'ambient i els han assimilats (Ramswamy et al., 2011); en la pols de les llars, i consegüentment en l'aire, a causa de l'ús dels cosmètics i productes d'higiene personal que s'apliquen per via dèrmica, especialment (Canosa et al., 2007).

2.1.3. *Metabolització dels parabens*

La metabolització dels PBs presenta diferències segons si la via d'exposició és la ingesta (oral), la via dèrmica o la via subcutània.

Per la via oral, els PBs són absorbits pel tracte gastrointestinal i seguidament hidrolitzats, majoritàriament per esterases no específiques del fetge, en PHBA (Aubert et al., 2012). La hidròlisi també pot tenir lloc a l'intestí o a la sang (Abbas et al., 2010; Boberg et al., 2010). Posteriorment, el PHBA pot ser conjugat amb glicina (forma l'àcid *p*-hidroxihíppúric o PHHA (*p*-hydroxyhippuric acid), el metabòlit principal), amb sulfats o amb l'àcid glucurònic. La conjugació amb l'àcid glucurònic es pot donar abans o després de la hidròlisi dels PBs gràcies a l'acció de les UDP-glucuronosiltransferases (UGT) (figura 4) (Abbas et al., 2010). Tant els PBs com els seus productes de degradació són transportats via sanguínia per tot el cos, on un petit percentatge es pot bioacumular, per exemple en els teixits grassos. En comparació amb la via oral, la via dèrmica presenta una absorció molt més lenta i és incompleta i dependent de la seva cadena alquil (com més petita és, més absorció hi ha) (Aubert et al., 2012; Boberg et al., 2010). Respecte a la via subcutània, presenta una capacitat d'absorció més gran que la dèrmica i assoleix la concentració màxima en plasma unes 4 hores després de l'exposició (Aubert et al., 2012). En ambdues vies i un cop els PBs són absorbits, ràpidament són hidrolitzats per esterases no específiques situades a la pell. Com les esterases del fetge, les de la pell són més eficients en PBs de cadena curta, de manera que el MetP és metabolitzat més ràpidament que el n-ButP (Abbas et al., 2010). Malgrat les esterases de la pell, els PBs que no són hidrolitzats, amb la circulació sanguínia van per tot l'organisme i també poden ser hidrolitzats al fetge (Fransway et al., 2019b). Cal destacar que, tant per via oral com dèrmica o subcutània, hi ha un petit percentatge de PBs circulants que no són hidrolitzats ni conjugats. Aquesta fracció de PBs va per l'organisme amb la circulació fins que són excretats, majoritàriament, per l'orina. Aquest percentatge és més gran en els PBs de cadena llarga, com és el cas del n-ButP, a causa de la poca especificitat de les esterases cap a ells (Aubert et al., 2012).

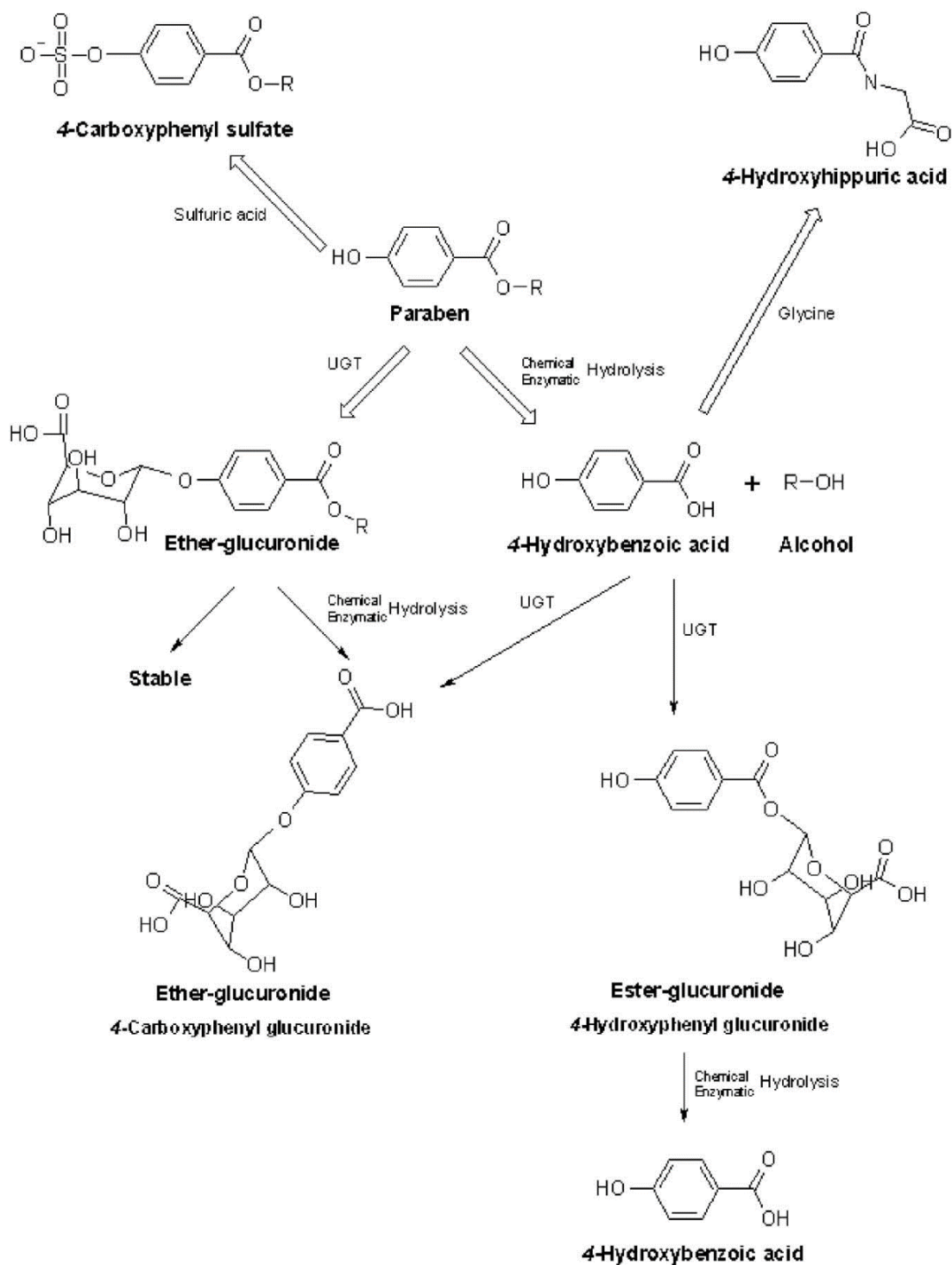


Figura 4. Metabolisme dels parabens. Imatge extreta (Abbas et al., 2010).

Independentment de la via, els PBs són excretats majoritàriament per l'orina durant les primeres 24 hores, majoritàriament com a PHBA i l'alcohol corresponent o com a metabòlits (èsters conjugats amb glicina, sulfats o àcid glucurònic) (Abbas et al., 2010; Janjua et al., 2008) (figura 4). També se'n troba un petit percentatge (2%) com a PBs lliures (Boberg et al., 2010). Com s'ha comentat amb anterioritat, la solubilitat dels PBs varia segons la cadena alquil. Així doncs, el MetP és el més soluble en aigua i, com a tal, presenta nivells relatius de PHBA i l'alcohol corresponent més elevats respecte a la resta de PBs. El MetP, com tots els PBs, també té nivells de PHBA conjugats en orina. Per la seva banda, el n-ButP té un augment relatiu, respecte als PBs de cadena curta, dels nivells de PBs conjugats (especialment amb la glicina o l'àcid glucurònic) o amb modificacions oxidatives a la cadena alquil o, fins i tot, a l'anell benzènic per augmentar la polaritat del compost i facilitar-ne així l'excreció per l'orina (Moos et al., 2016). No obstant això, el metabòlit principal en tots els PBs és el PHHA. A banda de l'orina, un 4% dels PBs i dels metabòlits poden ser excretats per les femtes (Aubert et al., 2012). Els PBs i productes de degradació tenen alts nivells d'excreció però Aubert et al. (2012) van observar com el 2% dels PBs no és excretat sinó acumulat en teixits.

2.1.4. Regulació legislativa dels parabens en la Unió Europea

A causa de l'interès social creixent envers els PBs i els múltiples estudis que s'hi relacionen, la Unió Europea (UE) n'ha regulat els seus usos i les dosis màximes. La Comissió Europea estableix que les concentracions màximes de MetP i EtP en productes d'higiene personal i cosmètics siguin del 0,4% si s'usen individualment o del 0,8% si s'usen combinats (Moos et al., 2016). Respecte del n-ProP i el n-ButP, la concentració màxima es marca al 0,19% quan s'usen de manera individual o de manera combinada, si la suma de les seves concentracions no sobrepassa el 0,19% (Darbre i Harvey, 2014). A més, Dinamarca va prohibir a l'any 2011 l'ús del n-ProP, el n-ButP i les seves isoformes en productes destinats a infants menors de 3 anys (Darbre i Harvey, 2014). Aquesta regulació també va ser acceptada per la UE. L'any 2014, la UE va prohibir l'ús de l'iProP, l'iButP, el PenP, el BenzP i el FenP en tota mena de productes d'higiene personal i cosmètics (Fransway et al., 2019a).

Pel que fa als aliments, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) i la Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) han establert que la ingesta diària admissible (IDA) sigui d'un màxim de 10 mg/kg pes corporal pel MetP, l'EtP i el n-ProP (EFSA, 2004 [accés el 28/04/2019]; JECFA, 1974). També recomanen excloure els PBs amb cadenes alquil llargues, i dins d'aquest grup també inclouen el n-ProP, tot i que no en prohibeixen l'addició. Tanmateix, també es poden trobar el n-

ButP, l'iButP i el HeptP com a additius alimentaris, malgrat que el seu ús és poc comú (Fransway et al., 2019a).

Respecte als productes farmacèutics, es recomana que les concentracions de PBs no excedeixin del 0,1%. Els PBs més utilitzats en aquest camp són el MetP, el n-ProP i el n-ButP seguits per l'iButP, el MetP sòdic i el ProP sòdic (Fransway et al., 2019a).

2.1.5. Toxicitat dels parabens

Com s'ha comentat amb anterioritat, un gran nombre d'estudis ha observat efectes adversos a causa de l'exposició dels PBs. Entre els múltiples efectes, els estrogènics i/o antiandrogènics han pres especial interès per part dels investigadors. Diversos autors han trobat alteracions en el nombre d'espermatozoides i en nivells de testosterona en rates i ratolins tractats oralment amb n-ButP (Kang et al., 2002; Oishi, 2001), també en el sistema reproductiu i en paràmetres espermàtics de cadells mascles tractats durant la gestació (Guerra et al., 2017). En femelles, Vo et al. (2010) van trobar canvis en el cicle estral i anormalitats histopatològiques en els ovaris i l'úter. No obstant això, els PBs tenen un potencial molt menor que el 17 β -estradiol, l'estrogen més important. Concretament, el n-ButP presenta un potencial d'unes 10.000 o 100.000 vegades menor respecte a l'estrogen natural en estudis *in vitro* o *in vivo*, respectivament (Monneret, 2017; Routledge et al., 1998). Cal destacar que, segons la cadena alquil, canvia el potencial estrogènic, que s'incrementa com més gran és aquesta. No obstant això, no solament s'han trobat efectes des del punt de vista reproductiu per part dels PBs, també s'ha vist com poden generar estrès oxidatiu al fetge de ratolins (Shah i Verma, 2011) o, fins i tot, en embrions de peixos (Brown et al., 2018). Tot i el potencial com a DE, els PBs es classifiquen com a *no-mutagènics* (Fransway et al., 2019a).

3. Efectes en el sistema endocrí a causa dels parabens

Els parabens poden afectar múltiples dianes relacionades amb el seu potencial endocrí i generar efectes adversos en òrgans endocrins (com les glàndules adrenals, el pàncrees o la tiroides, per exemple), o en el fetge com a òrgan detoxificador de xenobiòtics, o en la pell com a via d'exposició principal als PBs (Nowak et al., 2018). En aquests òrgans poden interactuar amb els RE o RA i generar efectes estrogènics o antiandrogènics, respectivament, o des del punt de vista mitocondrial o lisosòmic alterar-ne les funcions, o inhibir l'enzim sulfotransferasa (SULT), o generar espècies reactives d'oxigen o dany a l'ADN (figura 5).

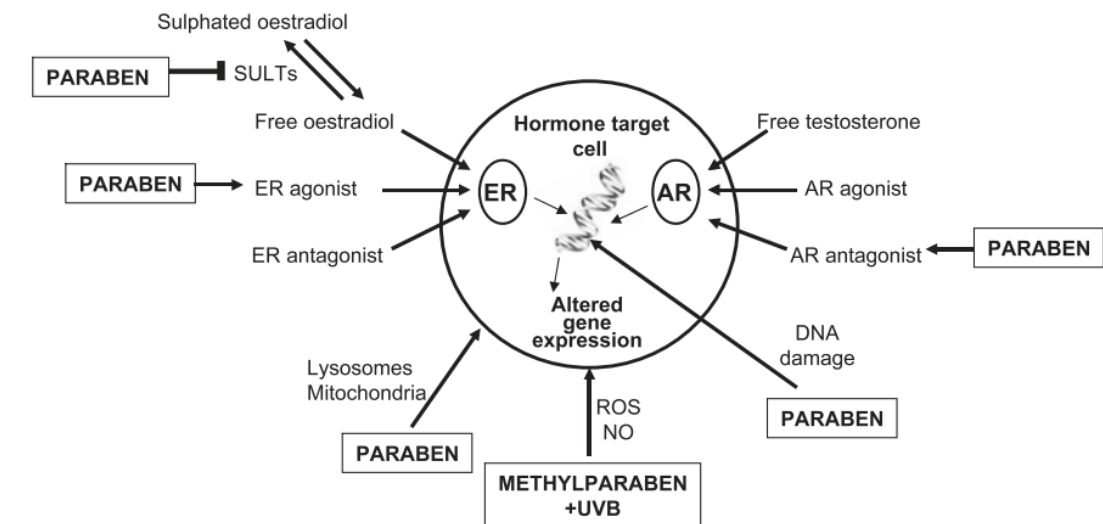


Figura 5. Diverses dianes dels parabens en la cèl·lula. SULTs, sulfotransferases; ER, *Estrogen Receptor*; AR, *Androgen Receptor*; ROS, *Reactive Oxygen Species*; NO, òxid nítric; UVB, raigs ultraviolats-B; DNA, àcid desoxiribonucleic. Imatge extreta (Nowak et al., 2018).

3.1. Efectes estrogènics dels parabens

Els disruptors endocrins amb efecte estrogènic són els que imiten l'acció dels estrògens i, com a tals, actuen per les vies dels RE. Els estrògens tenen un paper central en el desenvolupament i la maduració sexual, així com en les característiques secundàries de les femelles (Holst et al., 2004). També es troben en els mascles, tot i que en concentracions molt menors, en què intervenen en els processos de regulació de l'espermatoïtògenesis o en la reabsorció del líquid tubular seminífer, per exemple (Hess i Carnes, 2004). Els efectes estrogènics per part dels DEs poden ser inferiors, iguals o superiors a l'efecte ocasionat per l'estrogen natural, el 17 β -estradiol. Independentment del seu potencial, els DEs estrogènics provoquen en l'organisme que tots els processos relacionats amb els estrògens estiguin alterats i en generen una sobreactivació. També existeixen DEs amb efecte antiestrogènic, és a dir, que inhibeixen o redueixen els efectes produïts pels estrògens.

Estudis *in vitro* mostren com els PBs tenen afinitat pels RE α i β i poden actuar sobre l'expressió de gens dependents dels RE (Byford et al., 2002; Vo et al., 2011) i, consegüentment, generar efectes cel·lulars controlats per estrògens, per exemple, la proliferació cel·lular (Byford et al., 2002). Els PBs amb cadena alquil lineal, com més gran és aquesta, més afinitat tenen pels RE (Routledge et al., 1998; Vo et al., 2010). Respecte als PBs amb cadena alquil ramificada o un anell aromàtic, són els que presenten més afinitat pels RE. L'afinitat pels RE d'un determinat DE és la capacitat que té per unir-se al receptor. L'altre punt essencial és l'eficàcia, és a dir, la capacitat de generar una resposta

dels RE que fa que dimeritzin i es transloquin al nucli on activen la transcripció dels gens regulats per estrògens (Darbre i Harvey, 2008). Els PBs tenen una afinitat i eficàcia baixa amb els RE; així doncs, el seu potencial estrogènic va de 10.000 (n-ButP), 30.000 (n-ProP), 150000 (EtP) a 2.500.000 (MetP) vegades menys respecte del 17 β -estradiol (Routledge et al., 1998). Per aquest motiu són classificats com a DEs *febles*.

D'altra banda, Routledge et al. (1998) van analitzar els possibles efectes estrogènics dels PBs *in vivo*. Aquests investigadors van observar com el n-ButP presentava efectes estrogènics en rates femelles sexualment immadures (de 21 o 22 dies d'edat) quan es donava per via subcutània però no per via oral. Aquests resultats s'expliquen gràcies a les diferències en la metabolització dels PBs segons la via amb la qual entren a l'organisme. Prusakiewicz et al. (2007) van descriure un possible mecanisme que explica per què hi ha diferències en els efectes adversos segons si els PBs entren en contacte via oral o dèrmica. Quan els PBs són absorbits per la pell, les esterases els hidrolitzen però la seva concentració és inferior que les esterases del fetge. Conseqüentment, hi ha un increment relatiu de la concentració de PBs absorbits via dèrmica respecte als PBs absorbits oralment que genera una inhibició dels enzims sulfotransferases (SULTs). Les SULTs estan implicades en la inhibició dels estrògens mitjançant l'addició d'un grup sulfat. Aquests enzims serveixen per regular la concentració d'estrògens però la inhibició d'aquests per part dels PBs provocaria una no-sulfatació dels estrògens i, consegüentment, més concentració d'estrògens que derivarien en un efecte estrogènic més gran (figura 6). Aquest augment d'estrògens de manera indirecta per part dels PBs a la pell pot explicar per què per via dèrmica o subcutània els PBs presenten un potencial estrogènic més gran que per via oral.

Altres autors han suggerit un altre mecanisme d'acció en què els PBs són capaços d'inhibir la 17 β -hidroxiesteroid deshidrogenasa (17 β -HSD) tipus 2 (figura 6) (Engeli et al., 2017). La 17 β -HSD de tipus 2 és un enzim implicat en la conversió del 17 β -estradiol a estrona, un estrogen amb menys potencial. A causa de l'efecte inhibidor que generen els PBs sobre la 17 β -HSD de tipus 2, aquests presenten potència estrogènica, ja que no permeten que el 17 β -estradiol es converteixi en estrona (figura 6). No obstant això, també han suggerit la capacitat dels PBs, sobretot de cadena alquil llarga com l'HeptP, per inhibir la 17 β -HSD de tipus 1, enzim que catalitza la conversió de l'estrona en el 17 β -estradiol. Una inhibició d'aquest enzim significa menys concentració de 17 β -estradiol i, consegüentment, un efecte antiestrogènic (figura 6) (Engeli et al., 2017). Aquest fet mostra com el potencial estrogènic o antiestrogènic dels PBs depèn de diversos factors: l'expressió de la 17 β -HSD

tipus 1 i 2 en el teixit i el compost concret subministrat. També hi tenen un paper important la concentració, el lloc, l'espècie i el sexe de l'organisme que entra en contacte amb el compost, ja que els nivells hormonals d'estrògens entre femelles i mascles no són iguals.

Finalment, van Meeuwen et al. (2008) també van observar *in vitro* un efecte antiestrogènic per part dels PBs. Els PBs inhibeixen l'aromatasa, la qual és un enzim limitant en la conversió dels andrògens en estrògens i, per tant, la concentració d'andrògens es mantenia (figura 6).

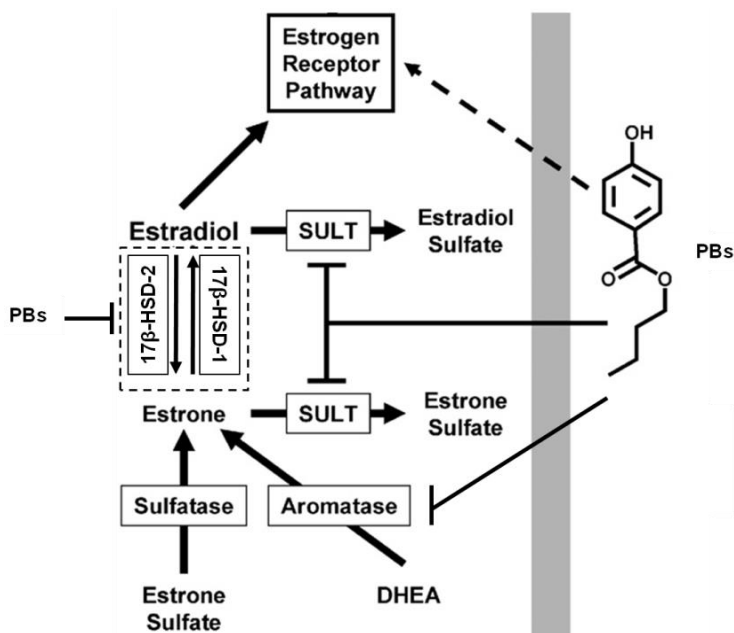


Figura 6. Esquema dels diversos mecanismes d'acció dels PBs en l'organisme. Efectes estrogènics: inhibició de les SULTs i de la 17β-HSD de tipus 2. Efectes antiestrogènics: inhibició de la 17β-HSD de tipus 1 i de l'aromatasa. DHEA, dehidroepiandristerona; PBs, parabens; SULTs, sulfotransferases; 17β-HSD, 17β-hidroxiesteroid deshidrogenasa. Imatge adaptada (Prusakiewicz et al., 2007).

3.2. Efectes antiandrogènics dels parabens

Els disruptors endocrins amb efecte androgènic són els que imiten l'acció dels andrògens i, com a tals, actuen per les vies dels RA. Els andrògens controlen el desenvolupament i la maduració sexual en els mascles i, també, els caràcters masculins secundaris. Les femelles també presenten andrògens però amb concentracions molt menors que els mascles. Els andrògens prenen part en el desig sexual i l'excitació, així com en la libido i, a més, són els precursors dels estrògens. Tal com passava amb els DEs estrogènics, els DEs androgènics impliquen la sobreactivació dels processos relacionats amb els andrògens. De la mateixa manera, en aquest cas també hi ha DEs antiandrogènics, l'efecte dels quals és la inhibició o reducció dels efectes produïts pels andrògens.

L'androgen més important és la testosterona, l'hormona masculina per excel·lència. La testosterona està relacionada amb el procés d'espermatogènesi, i les alteracions en la seva concentració poden desencadenar problemes d'infertilitat masculina. Centrant-se en els PBs, s'ha vist com poden tenir un lleuger potencial antiandrogènic. Es poden unir als RA i provocar alteracions testiculars (Fransway et al., 2019b). També poden disminuir la concentració de testosterona i, consegüentment, la qualitat i/o la quantitat d'esperma (Boberg et al., 2016; Guerra et al., 2017; Oishi, 2004, 2002a, 2002b, 2001). En humans, Meeker et al. (2011) han observat una correlació positiva entre la quantitat de PBs excretats en orina i dany en l'ADN espermàtic, malgrat que aquest dany no ha estat correlacionat amb la disminució de la qualitat espermàtica.

4. Efectes dels parabens en el sistema reproductor masculí de rates

Els parabens poden provocar una sèrie d'alteracions en l'organisme, en què les del sistema reproductor presenten un gran interès. La gran majoria d'estudis toxicològics dels PBs en l'àmbit reproductiu s'han dut a terme en femelles o femelles embarassades de rosegadors. No obstant això, els PBs també tenen capacitat disruptora en el sistema reproductor masculí. Addicionalment, com més gran és la cadena alquil dels PBs, més gran el potencial estrogènic. Per aquest motiu, en aquesta tesi doctoral el compost escollit per analitzar els efectes sobre el sistema reproductor de rates mascle va ser el n-ButP, que presenta un potencial estrogènic més gran respecte a la resta de PBs permesos amb cadena alquil lineal.

El sistema reproductor d'una rata mascle es considera sexualment madur als 75 dies d'edat, i als 90 dies d'edat ja és reproductivament madur (Luetjens i Weinbauer, 2012). A continuació veurem les generalitats del sistema reproductor masculí d'una rata reproductivament madura; així com els efectes de diferents PBs, especialment del n-ButP.

4.1. Generalitats del sistema reproductor masculí de rates

El sistema reproductor masculí en rates està format pels testicles, el conducte eferent i l'epidídim, i els òrgans sexuals accessoris (pròstata, vesícula seminal i glàndula coaguladora). Aquest sistema està perfectament regulat i les hormones hi tenen un paper primordial.

4.1.1. Òrgans sexuals i sexuals accessoris

4.1.1.1. Testicles

Els testicles són l'òrgan principal del sistema reproductor masculí. Presenten dues funcions principals: **produir espermatozoides** (espermatogènesi) i **produir andrògens** per mantenir i regular totes les funcions de l'organisme dependents d'andrògens.

Els testicles estan formats per un conjunt de túbuls seminífers, encarregats de produir espermatozoides i de transportar-los cap a l'epidídim, on s'agrupen en lòbuls. En els túbuls seminífers destaquen tres tipus de cèl·lules: les *cèl·lules de Sertoli*, que tenen una funció de suport; les *cèl·lules de Leydig*, que secreten hormones, i les *cèl·lules germinals*, que van diferenciant-se des dels espermatogonis fins als espermatozoides immadurs durant el procés d'espermatogènesi (figura 7). També es troben les *cèl·lules mioïdes*, que envolten els túbuls seminífers i s'encarreguen de provocar els moviments tubulars per conduir els espermatozoides immadurs alliberats a la llum del túbul cap a l'epidídim (figura 7).

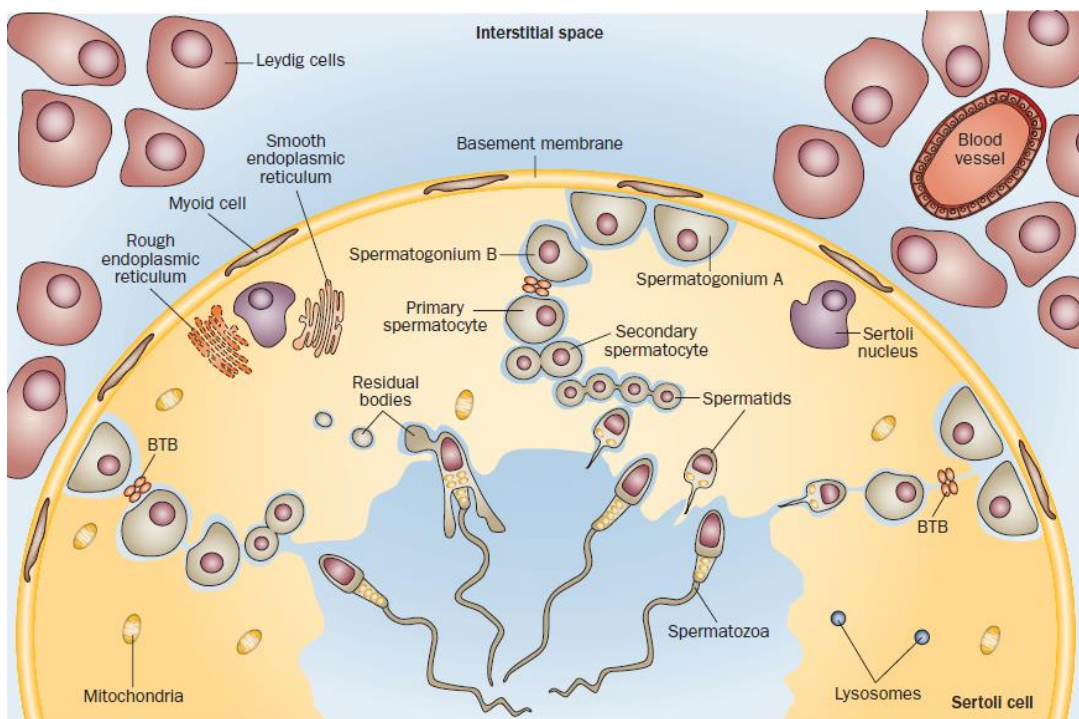


Figura 7. Representació d'un túbul seminífer en què s'observa l'estructura, les diferents cèl·lules principals, així com el procés d'espermatogènesi. BTB, barrera sang-testicular. Imatge extreta (Rato et al., 2012).

Respecte a les **cèl·lules de Sertoli**, es troben a la capa basal dels túbuls seminífers i s'estenen fins a la llum del túbul. Tenen diverses funcions: reforcen el procés d'espermatogènesi perquè presenten RA i receptors de la FSH; tenen un paper important en la formació de la barrera sang-testicle (*Blood-Testis barrier*, BTB) mitjançant unions adherents i estretes, de tal manera que permeten separar l'ambient en dos compartiments: el basal i l'adluminal. També fixen les cèl·lules germinals per evitar que les cèl·lules germinals no madures es desgastin; engloben diversos estadis de maduració de les cèl·lules germinals i permeten l'alliberació dels espermes a la llum tubular (Hill, 2019 [accés el 07/05/2019]; O'Donnell et al., 2001).

Per la seva banda, les **cèl·lules de Leydig** se situen al compartiment intersticial i són les principals productores de testosterona. Així doncs, tenen un paper destacat en la maduració sexual, gràcies a l'acció de la testosterona sobre el procés d'espermatogènesi, i en el desenvolupament de les característiques sexuals secundàries (Hill, 2019 [accés el 07/05/2019]).

Respecte a les **cèl·lules germinals**, es veuran específicament en el procés d'espermatogènesi (*apartat 4.1.2.*).

4.1.1.2. Epidídim i conducte eferent

L'epidídim i el conducte eferent són els altres òrgans principals del sistema reproductor masculí. Tenen tres funcions principals: **reabsorbir** el líquid tubular seminífer; **modificar** i **madurar** els **espermatozoides**, i finalment **emmagatzemar** els **espermatozoides** madurs (OECD, 2008). L'epidídim presenta entre 7 i 13 conductes eferents, els quals són els encarregats d'unir la xarxa testicular del testicle, aglomeració de tots els túbuls seminífers que conformen el pas previ a la sortida dels espermatozoides al conducte eferent, amb el cap de l'epidídim.

Entre la xarxa testicular i el cap de l'epidídim té lloc part de la reabsorció del líquid tubular seminífer secretat per les cèl·lules de Sertoli. En la xarxa testicular s'absorbeix gran part d'aquest líquid i fins al 98% serà absorbit després del pas per la xarxa testicular, el conducte eferent i, finalment, l'epidídim. Aquest procés de reabsorció té com a objectiu la concentració dels espermatozoides i és controlat per estrògens (Hess i Carnes, 2004). Tant en la xarxa testicular com en la cua de l'epidídim, els nivells d'estrògens són molt elevats: arriben a ser 25 vegades més en la cua de l'epidídim que en el plasma (Carreau et al., 2003).

Els espermatozoides que arriben a l'epidídim són immadurs i no presenten mobilitat; per tant, no tenen capacitat per fecundar l'òvul. Així doncs, a mesura que van passant per l'epidídim, van guanyant aquesta capacitat. Durant el pas pel cap i el cos de l'epidídim hi ha una sèrie de secrecions que provoquen modificacions en la membrana espermàtica. Finalment, quan arriben a la cua, els espermatozoides acaben de madurar, perden la resta de citoplasma que encara conservaven i adquireixen mobilitat. A la cua de l'epidídim també són emmagatzemats i immobilitzats, gràcies a una matriu de glicoproteïna, la qual els manté immòbils i protegits fins al moment de l'ejaculació (OECD, 2008). Unit a la cua es troba el vas deferent, el qual és un múscul encarregat de portar tots els espermatozoides madurs fins als conductes ejaculadors, on, un cop allí, s'uneixen amb els fluids secretats per la pròstata, la vesícula seminal i la glàndula coaguladora per formar el semen. Concretament, el vas deferent no es considera pròpiament una part de l'epidídim tot i ser-ne una continuació (Picut et al., 2018).

4.1.1.3. Òrgans sexuals accessoris

Els òrgans sexuals accessoris són tres: la pròstata, la vesícula seminal i la glàndula coaguladora. Se situen al llarg de la ruta de la uretra, ja que van del vas deferent a l'exterior pel penis. Són òrgans necessaris però realitzen una funció de complementació dels espermatozoides: secreten una sèrie de fluids per obtenir el semen en l'ejaculació. Aquests fluids serveixen per transportar els espermatozoides, per neutralitzar l'ambient àcid de la vagina i la resta del tracte femení, subministrar substrats metabòlics a l'esperma perquè obtingui l'energia necessària durant el recorregut i, en rosegadors, formar el tap vaginal, que és la coagulació del semen per evitar possibles copulacions i ejaculacions posteriors (OECD, 2008). Els tres òrgans sexuals accessoris i la seva activitat exocrina són altament sensibles als nivells d'andrògens.

Específicament, la **pròstata** secreta un líquid serós sense color a la uretra a través de diferents ductes. Aquest líquid és ric en enzims proteolítics, zinc, àcid cítric, inositol i transferrina, els quals són substrats metabòlics per als espermatozoides. Entre el 15% i el 30% del líquid ejaculat prové de les secrecions de la pròstata. Per la seva banda, la **vesícula seminal** presenta un fluid blanc groguenc anomenat *líquid seminal*. El líquid seminal és alcalí per neutralitzar l'acidesa de la vagina i ric en àcid cítric, fructosa i lactoferrina, per oferir substrats metabòlics als espermatozoides. Entre el 50% i el 80% del líquid ejaculat prové del líquid seminal. Finalment, els fluids de la **glàndula coaguladora** permeten generar el tap vaginal en les femelles a causa de la coagulació del semen

(OECD, 2008). Moltes vegades se la considera un lòbul de la pròstata i rep el nom de *lòbul dorsocranial* (Picut et al., 2018).

4.1.2. Procés d'espermatogènesi

El procés d'espermatogènesi és quan els espermatogonis —cèl·lules mare, diploides (2n)— es converteixen en espermatozoides —cèl·lules diferenciades, haploides (n)— i té una duració aproximada de 57 dies en rates (Creasy, 1997). Aquest procés té lloc als túbuls seminífers dels testicles. Les rates presenten entre 10 i 20 túbuls seminífers en cada testicle (OECD, 2008).

La regulació clàssica de l'espermatogènesi involucra l'eix hipotàlem-hipofisari-gonadal (HT-HF-G) i l'alliberació de l'hormona alliberadora de gonadotropina (*gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) i les hormones FSH, LH i testosterona (figura 8).

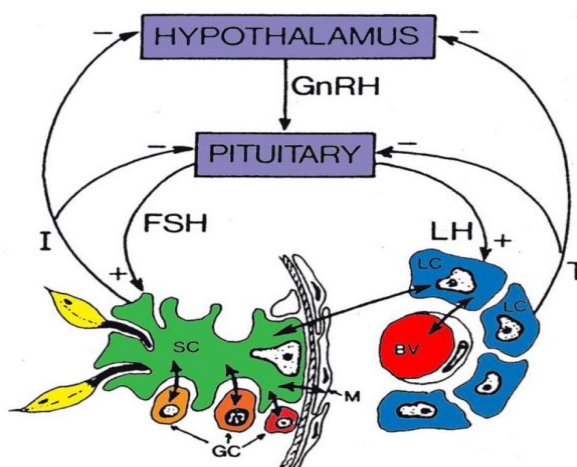


Figura 8. Regulació hormonal de l'espermatogènesi. GnRH, hormona alliberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizant; FSH, hormona estimulant del fol·licle; I, inhibina; T, testosterona; SC, cèl·lules de Sertoli; LC, cèl·lules de Leydig; BV, vasos sanguinis; M, cèl·lules mioides (encarregades de les contraccions dels túbuls seminífers); GC, cèl·lules germinals. Imatge extreta (OECD, 2008).

La **GnRH** és alliberada des de l'hipotàlem (HT) cap a la hipòfisi (HF), on l'estimula. La HF allibera a la circulació la LH i la FSH com a resposta a l'estímul de la GnRH. La **LH** actua sobre les cèl·lules de Leydig, les quals s'estimulen i secreten testosterona. La **testosterona** pot ser alliberada a l'espai intersticial, d'on anirà a les cèl·lules de Sertoli o a la circulació (per poder distribuir-se per la resta de l'organisme). D'altra banda, la **FSH** actua directament sobre les cèl·lules de Sertoli i modula l'espermatogènesi. Així doncs, en les cèl·lules de Sertoli s'observa l'acció per part de la FSH alliberada per la HF, i per la testosterona alliberada per les cèl·lules de Leydig. No obstant això, hi

ha una retroalimentació (*feedback*) negativa per part de la testosterona i la **inhibina** (secretada per les cèl·lules de Sertoli) que afecten l'HT i la HF i n'inhibeixen la secreció hormonal (OECD, 2008). A més, en algunes cèl·lules del testicle es dona una **secreció paracrina** de pèptids i factors de creixement per tenir un control local de les diverses funcions cel·lulars dels túbuls seminífers i de les cèl·lules de l'endoteli sanguini (Carreau et al., 2003).

L'espermatogènesi és un procés molt complex en què actuen un gran nombre d'òrgans interconnectats a través d'un sistema en cascada de diferents hormones, l'acció de les quals permet iniciar posteriorment tota la maduració de les cèl·lules germinals dins dels túbuls seminífers. L'espermatogènesi (figura 9) s'inicia amb els **espermatogonis** que es van auto-renovant, produeixen noves cèl·lules mare i alguns comencen a diferenciar-se en els diferents tipus d'espermatogonis —de tipus A (A_1 - A_4), intermediaris i B— fins que els de tipus B experimenten una última divisió mitòtica que donarà lloc a l'**espermatòcit primari** (figura 9). Tant els espermatogonis com els espermatòcits primaris són cèl·lules diploides (Hess, 1999; Rato et al., 2012). Aquest primer espermatòcit duplica l'ADN. Seguidament, es condensa la cromatina i es formen les cromàtides en la fase mitòtica del leptotè, que ve seguida de l'aparellament d'aquestes en la fase del paquitè. Finalment, es dona la recombinació del material genètic en la fase del diplotè i tot seguit les dues divisions meiòtiques consecutives, que conclouen amb l'espermàtida (O'Donnell et al., 2001; Russell et al., 1990). Després de la primera meiosi, anomenada *meiosi I*, els espermatòcits de primer ordre o primaris formen els **espermatòcits de segon ordre** o **secundaris** —cèl·lules haploides, n — (figura 9). Aquests espermatòcits secundaris es divideixen en la *meiosi II* per donar lloc a les **espermàtides**, també cèl·lules haploides (figura 9) (OECD, 2008).

La primera espermàtida que trobem presenta una morfologia rodona però ràpidament experimenta una sèrie de canvis morfològics en què l'ADN es condensa i s'elonga a la regió del cap. D'altra banda, el citoplasma dels espermatòcits es converteix en el que posteriorment serà la cua. Tot aquest procés de diferenciació de les espermàtides presenta 19 passos diferents en rata i es coneix amb el nom d'*espermiogènesi* (figura 9) (O'Donnell et al., 2001; OECD, 2008). En el pas 8 de l'espermiogènesi es forma una estructura hormono-dependent anomenada *especialització ectoplasmàtica*, que està present durant tot el procés d'elongació de les espermàtides i s'elimina en l'alliberació de les esperàtides a la llum del túbul seminífer (McLachlan et al., 2002). L'alliberació de les espermàtides com a **espermatozoides immadurs** rep el nom d'*espermioció* i es considera una etapa de l'espermiogènesi (O'Donnell et al., 2001; Russell, 1993).

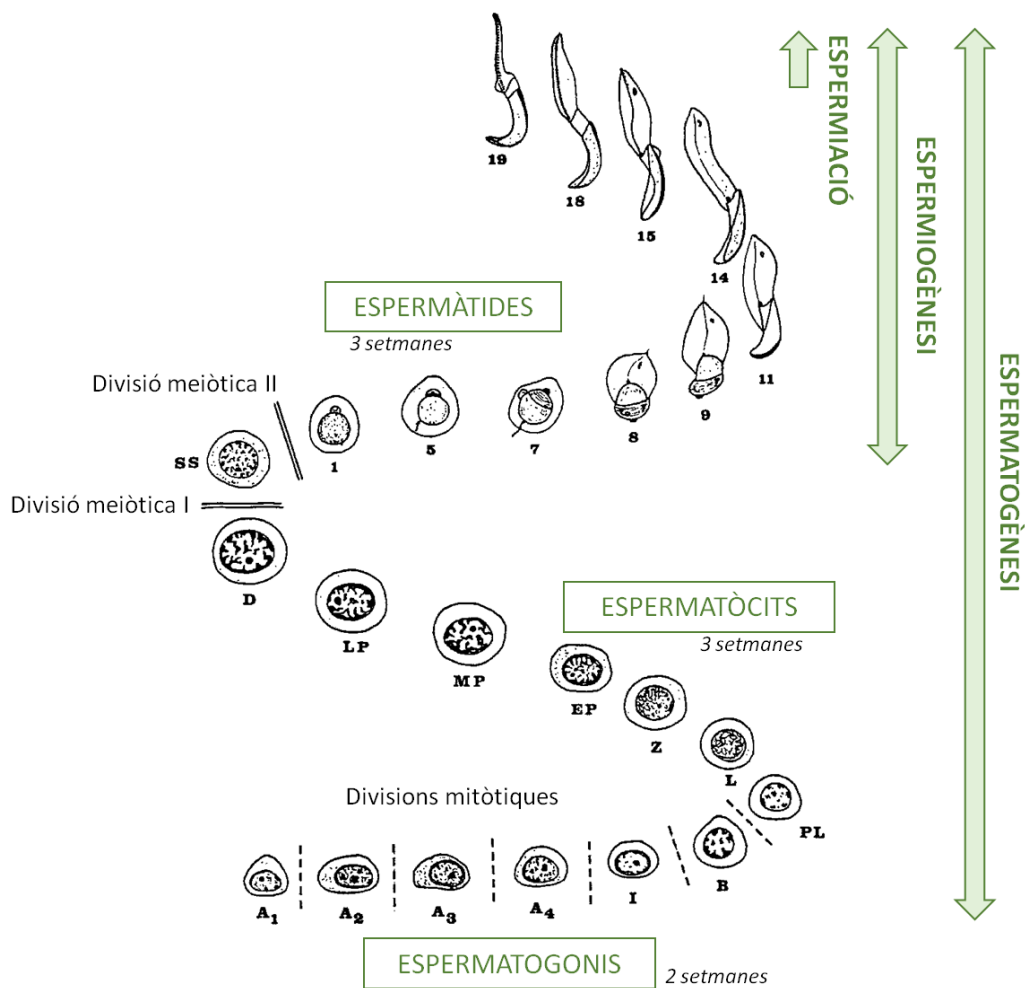


Figura 9. Cicle de l'espermatogènesi (57 dies de duració) en ratolí. En la imatge s'observen: espermatogonis (tipus A, A₁ - A₄; I, intermediari; tipus B); espermatòcits primaris (fases meiotiques: PL, preleptotè; L, leptotè; Z, zigotè; EP, MP i LP: espermatòcits en la fase paquíetè; D, diplotè) i secundaris (SS, espermatòcit secundari); espermatòides (1-19, passos corresponents a la maduració de les espermatòides), així com les divisions mitòtiques i les dues divisions meiotiques (I i II). Imatge adaptada (Creasy, 1997).

El procés d'espermatogènesi en ratolí és un cicle de 57 dies de duració que comprèn diversos estadis de maduració perfectament sincronitzats entre si. Aproximadament cada 13 dies s'inicia un nou cicle; per tant, quan el primer cicle s'ha completat, ja s'han iniciat 4,5 cicles més d'espermatogènesi per cada cicle finalitzat. Així doncs, sempre hi ha producció d'espermatozoides als túbul seminífers. Morfològicament, quan una cèl·lula germinal està en un determinat pas de l'espermatogènesi, la resta de cèl·lules del túbul seminífer sempre estan a un mateix estat de maduració. En la ratolí, aquesta característica del procés d'espermatogènesi es divideix

morfològicament en 14 etapes o estadis diferents (figura 10) (Creasy, 1997). Les etapes es mouen com una onada al llarg del túbul seminífer com una sèrie d'associacions cel·lulars successives que van coincidint en el pas del túbul i el temps (Griswold, 2016). Cada secció del túbul seminífer presenta una etapa determinada però al llarg de les diverses seccions es van trobant les diverses etapes ordenades. És com si l'espermatogènesi s'anés movent com una onada al llarg del túbul, garantint la presència permanent de tots els passos del cicle d'espermatogènesi (Griswold, 2016).

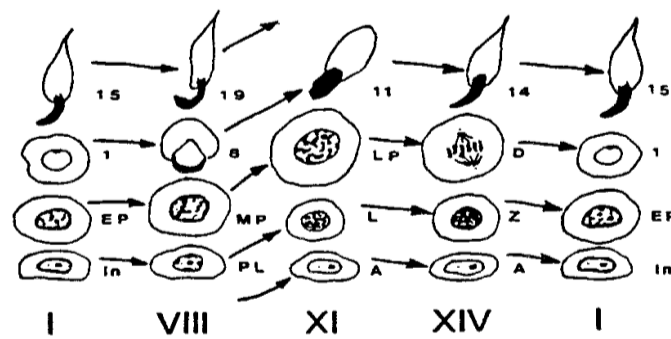


Figura 10. Representació esquemàtica de les etapes o estadis dels túbuls seminífers en rata. S'observen les etapes I, VIII, XI i XIV i els estadis cel·lulars corresponents a cadascuna. Concretament, es troben representats: espermatogonis (tipus A; In, intermediari); espermatòcits primaris (fases meiotiques: PL, preleptotè; L, leptotè; Z, zigotè; EP, MP i LP: espermatòcits en la fase paquíetè; D, diplotè); espermatòcits (passos 1, 8, 11, 14, 15 i 19, corresponents a la maduració de les espermatòcits). Imatge extreta (Creasy, 1997).

4.1.2.1. L'espermatozoide

L'espermatozoide és el gàmeta masculí. Els espermatozoides madurs s'emmagatzemen a la cua de l'epidídim fins a l'ejaculació. Aquests espermatozoides ja han perdut la resta de citoplasma i presenten mobilitat. La seva morfologia té tres zones diferenciades: el cap, el coll i la cua.

El cap presenta una morfologia de ganxo, el qual està recobert per una glicoproteïna. A més, es troba una vesícula anomenada *acrosoma* (O'Donnell et al., 2001; Russell et al., 1990). Aquesta vesícula és plena d'enzims hidrolítics que permeten a l'espermatozoide fecundar l'òvul. L'acrosoma és sensible a la progesterona o a la unió amb la zona pel·lúcida de l'òvul, de tal manera que quan rep algun d'aquests estímuls allibera tot el seu contingut enzimàtic i dona lloc a l'anomenada *reacció de l'acrosoma*. Aquesta reacció implica dos moments destacats: un primer moment ràpid, que es basa en un flux de calci des de l'interior de l'espermatozoide que permet l'obertura de porus i l'alliberament d'altres vesícules, seguit d'un segon moment més lent, que és l'activació de

l'adenilat ciclasa gràcies al calci. Sota aquestes cobertes de protecció al cap, es troba el nucli amb tot el material genètic, de tal manera que quan hi ha la fecundació, pot ser alliberat a l'òvul per formar el zigot. El material genètic del nucli està altament condensat gràcies a unes protamines específiques de l'espermatozoide. El coll dels espermatozoides presenta un gran nombre de mitocondris per produir l'energia necessària per a la mobilitat espermàtica. Per acabar, la cua dels espermatozoides dota de mobilitat gràcies als moviments ocasionats pel flagel. En la cua hi ha els axonemes, que són microtúbuls.

4.2. Alteracions en el sistema reproductor masculí a causa de l'exposició als parabens

Com a disruptors endocrins, els PBs presenten un gran interès en els possibles efectes en l'àmbit reproductiu. Com s'ha comentat anteriorment i breument, hi ha un gran nombre d'estudis envers els efectes adversos dels PBs en el sistema reproductor. El n-ButP és el compost escollit, no obstant això, també s'analitzaran els efectes dels altres PBs en el sistema reproductor masculí.

Pel que fa a *in vivo*, hi ha molts estudis que subministren els PBs via oral, tant en rates com en ratolins. De forma general, s'observen sobretot alteracions en els paràmetres espermàtics de mobilitat i recompte d'espermatozoides així com la disminució dels nivells hormonals, especialment la testosterona. Oishi (2002a, 2002b, 2001) va realitzar estudis del n-ButP i el n-ProP a través de la dieta en rosegadors mascles de 3 i 4 setmanes d'edat. Va trobar reducció en la qualitat espermàtica i en la concentració de testosterona. A més, també va veure com el n-ButP afectava el pes de l'epidídim i la vesícula seminal. No obstant això, Hoberman et al. (2008) van intentar reproduir els estudis de l'Oishi, anteriorment esmentats, però no van aconseguir repetir-ne els resultats. A més, altres autors tampoc van trobar cap alteració des del punt de vista del sistema reproductor i hormonal a causa de l'exposició oral als PBs (Gazin et al., 2013). Addicionalment a aquests resultats negatius, Fisher et al. (1999) van injectar subcutàniament n-ButP a la dosi de 2 mg/kg/d a mascles neonatals de rata durant 16 dies i tampoc van observar cap paràmetre reproductiu afectat. Tanmateix, diversos estudis van observar alteracions a causa dels PBs. Riad et al. (2018) van tractar oralment rates mascle de 21 dies d'edat amb n-ButP durant 8 setmanes. Aquests mascles presentaven reducció del nombre i de la mobilitat espermàtica, reducció de la concentració de testosterona, LH i FSH i augment del 17β -estradiol, a banda d'atròfia en la pròstata i la vesícula seminal. També van trobar dany en l'ADN testicular. Altres autors han descrit l'augment del nombre de cèl·lules de l'espermatogènesi apoptòtiques després de l'exposició al n-ButP (Alam et al., 2014).

Si observem l'efecte dels PBs a través d'exposició materna, s'observen sobretot alteracions en els paràmetres espermàtics i en els nivells hormonals, efectes similars als anteriorment descrits. Kang et al. (2002) van tractar rates subcutàniament amb n-ButP des del dia de gestació (DG) 6 fins al dia postnatal (DPN) 20. Van observar com els mascles es veien afectats i mostraven la reducció del nombre d'espermatozoides i espermàtides mentre que les femelles no es veien afectades. D'altra banda, Zhang et al. (2014) van tractar rates oralment amb n-ButP des del DG 7 al DPN 21. Aquests autors van observar retard en la separació prepucial, així com disminució de la distància anogenital i del pes dels testicles, epidídim i vesícula seminal. També van trobar disminució de la concentració de testosterona, LH i FSH i augment del 17β -estradiol. En l'àmbit espermàtic, van trobar reducció en el nombre d'espermatozoides. Per la seva banda, Boberg et al. (2016) van tractar via gavatge amb n-ButP des del DG 7 al DPN 22 i també van trobar resultats similars al Zhang et al. (2014). També van observar l'alteració en l'expressió gènica de l'aromatasa i altres gens implicats en la esteroidogènesi, paràmetres que també indiquen l'efecte estrogènic i antiandrogènic per part del n-ButP. Recentment, Guerra et al. (2017) van tractar oralment amb n-ButP des del DG 12 fins al DPN 21 i també van observar certs efectes adversos anteriorment descrits, a banda d'alteracions en el procés d'espermatogènesi. D'altra banda, Taxvig et al. (2008) van mirar l'efecte de diferents PBs solament en els fetus de rata. Aquests autors van tractar subcutàniament femelles embarassades de rata amb EtP i n-ButP des del DG 7 al 21 però no van trobar cap efecte advers en els fetus dels mascles.

En humans, també s'ha trobat relació entre problemes de fecunditat i la presència de PBs en l'orina dels subjectes de l'estudi. El 1984 va sorgir un estudi dirigit per Glander et al. que analitza la toxicitat reproductiva dels PBs en humans, especialment la contaminació microbiològica del semen ejaculat sense preservar i després de criopreservar-lo amb MetP com a agent preservant. Aquests autors van veure com el medi actuava com a preservant i reduïa la contaminació microbiològica però també com afectava la mobilitat espermàtica. Altres autors van observar un efecte espermicida per part dels PBs, els quals podien actuar sobre la membrana espermàtica i l'acrosoma (Song et al., 1991). Actualment, hi ha estudis que fan correlacions entre homes infèrtils i la concentració de PBs (i metabòlits) en orina. De moment, aquests estudis no han trobat relació entre la qualitat espermàtica i les concentracions de PBs excretats per l'orina (Adoamnei et al., 2018; Nishihama et al., 2017; Scinicariello i Buser, 2016) tot i que Smarr et al. (2017) van relacionar l'augment de les concentracions de MetP i EtP en l'orina amb el temps que necessitaven les

parelles per aconseguir la fecundació. A més, Meeker et al. (2011) van trobar correlació entre el dany de l'ADN dels espermatozoides i les concentracions del n-ButP en orina.

Com es pot veure, hi ha una gran quantitat d'estudis que se centren en els efectes dels PBs sobre el sistema reproductor masculí a causa del seu potencial estrogènic i antiandrogènic. Molts conclouen que els PBs tenen capacitat d'alterar certs paràmetres reproductors masculins. Generen, essencialment, problemes en els nivells hormonals, la reducció de la qualitat espermàtica i alteracions des del punt de vista histològic. A més, destaca la importància de la via i del compost. Generalment, l'exposició per via subcutània genera més efectes que l'exposició per via oral. Aquest punt s'explica gràcies a les diferències de metabolització que hi ha entre la via oral i la via dèrmica o subcutània. Cal recordar que l'exposició humana als PBs és, sobretot, per via dèrmica. Respecte al compost, els PBs amb cadena alquil llarga (n-ProP, n-ButP, i les respectives isoformes) poden causar efectes adversos més grans que els PBs de cadena alquil curta. Aquest fet s'explica pel canvi de potencial estrogènic que tenen els diferents tipus de PBs, en què els de cadena alquil llarga presenten més potencial estrogènic. A més, les esterases són menys eficients hidrolitzant-los. No obstant això, hi ha estudis que presenten resultats contradictoris.

5. Estrès oxidatiu, sistema reproductor masculí i parabens

5.1. Conceptes generals de l'estrès oxidatiu

Els processos biològics aeròbics usen oxigen (O_2) com a substrat base i generen reaccions d'oxidació i reducció, les quals estan íntimament relacionades, per generar energia. Aquests processos estan en perfecta homeòstasi però si s'alteren es pot generar un estat d'oxidació. Aquest estat es coneix amb el nom d'**estrès oxidatiu** (EO) i s'ha definit (Sies et al., 2017) com a:

Desequilibri entre espècies oxidants i antioxidants a favor de les oxidants, les quals condueixen cap a una disrupció de la senyalització i control dels processos d'oxidació-reducció i/o dany molecular.

Els processos aeròbics es generen essencialment al mitocondri, on té lloc la cadena de transport d'electrons que agafa O_2 per a la producció d'ATP. No obstant això, altres processos bioquímics, tals com l'oxidació de catecolamines o l'activació dels neutròfils i macròfags en la fagocitosi, poden generar EO. Cal destacar que l'EO no solament és generat per fonts endògenes. Fonts exògenes tals com les radiacions ionitzants, els raigs ultraviolats (UV), la calor, les infeccions o els xenobiòtics i la

seva detoxificació el poden causar. Posteriorment farem una especial menció als xenobiòtics, concretament als DEs.

Actualment està apareixent el terme **estrès reductor** (ER). Se sap que l'EO és beneficiós per a alguns processos cel·lulars de senyalització o per a la fagocitosi, de tal manera que la reducció en la generació de substàncies oxidants en aquests processos pot causar alteracions en l'organisme. Aquestes alteracions estan donades per un excés de poder reductor i generen l'ER. No obstant això, l'ER també es pot donar a causa del desajustament de les substàncies amb poder reductor i poder oxidant, en què les primeres s'imposen a les segones. L'ER pot ser beneficiós o perjudicial en l'organisme com l'EO i actuar sobre diferents processos biològics. Malgrat això, el terme *estrès reductor* encara és poc clar i està per definir (Bellezza et al., 2018; Gutteridge i Halliwell, 2018).

5.1.1. *Espècies reactives d'oxigen*

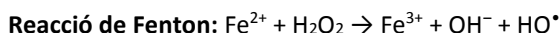
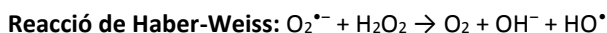
L'*estrès oxidatiu* és el terme que defineix el desequilibri entre espècies oxidants i antioxidants. Malgrat que les primeres són associades a termes negatius i de dany a l'organisme, poden representar un paper beneficiós en certs processos com ara la senyalització cel·lular o la fagocitosi (Segura, 2014). No obstant això, si es produeixen en excés i en moments no desitjables, són espècies altament tòxiques. Aquestes espècies químiques reben el nom d'*espècies reactives d'oxigen* (ERO) encara que no són les úniques capaces de generar dany. Es troben també les espècies reactives de nitrogen (ERN), espècies derivades del sofre o del clor, entre altres. Entre totes, tenen especial menció els radicals lliures (RLL) que es defineixen (Betteridge, 2000) com a:

Espècies químiques que contenen un o més electrons desaparellats en els seus orbitals atòmics o moleculars.

Els radicals lliures són altament reactius a causa del desaparellament electrònic que presenten.

Per entendre la generació de les ERO i els RLL, s'ha de destacar que el O₂ usat en la cadena de transport d'electrons genera entre un 1% i un 4% d'anió superòxid (O₂^{•-}) (Cano-Europa et al., 2015). A part de la citocrom c oxidasa (o complex IV de la cadena de transport d'electrons), el O₂^{•-} pot ser generat per la NADPH oxidasa (en la fagocitosi), el citocrom P450 hepàtic (en la detoxificació) o en la xantina-oxidasa (en la reperfusió isquèmica) (Segura, 2014). El O₂^{•-} es forma quan l'oxigen molecular agafa un electró i l'incorpora a la seva òrbita més externa. El O₂^{•-} té una gran capacitat reactiva amb proteïnes que presenten un grup prostètic metàl·lic però no interactua amb altres tipus de proteïnes, ni amb gaire especificitat sobre lípids ni àcids nucleics.

L'anió superòxid es transforma en peròxid d'hidrogen (H_2O_2) gràcies a l'acció de l'enzim superòxid-dismutasa (SOD). El H_2O_2 és molt més estable i la seva eliminació té lloc gràcies a l'acció de dos enzims: la catalasa (CAT) i la glutatió peroxidasa (GPx). No obstant això, tant el $O_2^{\bullet-}$ com el H_2O_2 poden transformar-se en el radical hidroxil (HO^{\bullet}) en presència de ions metàl·lics. L' HO^{\bullet} és un RLL molt potent amb una vida mitjana més petita que el $O_2^{\bullet-}$. És molt inespecífic i pot atacar moltes biomolècules (Martínez Álvarez et al., 2007). Les dues reaccions donades són:



D'altra banda, si el $O_2^{\bullet-}$ no és transformat en H_2O_2 ràpidament, pot incorporar un protó i transformar-se en el radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), el qual és altament reactiu o bé incorporar l'òxid nítric (NO) i generar el peroxinitrit ($ONOO^-$), les dues espècies d'ERN. A la taula 2 es mostren les ERO més comunes.

Taula 2. Espècies reactives d'oxigen (ERO), classificades segons si són o no radicals lliures.

Radicals lliure	No radicals lliures
Anió superòxid ($O_2^{\bullet-}$)	Peròxid d'hidrogen (H_2O_2)
Radical hidroxil (HO^{\bullet})	Lipohidroperòxid (LOOH)
Radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet})	Ozó (O_3)
Radical peroxil (ROO^{\bullet})	Singlet d'oxigen (1O_2)
Radical alcoxil (RO^{\bullet})	Hipoclorit (ClO^-)
	Complexos de Ferro-Oxigen ($Fe=O$)
	Òxid nítric (NO)

5.1.2. Sistemes antioxidants

S'ha vist com les espècies reactives d'oxigen poden ser necessàries en alguns processos i en altres poden causar danys. Enfront d'això últim, els organismes han desenvolupat un sistema antioxidant per combatre les ERO. El sistema antioxidant està format per les espècies antioxidants que es defineixen (Halliwell i Gutteridge, 1999) com a:

Qualsevol espècie que en presència d'un substrat oxidable en retarda considerablement o n'inhibeix l'oxidació.

Cal destacar que també existeixen espècies antioxidants exògenes amb un paper clau en la regulació de les ERO. El sistema antioxidant ha estat dividit en dos grans grups: el sistema enzimàtic o preventiu i el sistema no enzimàtic o bloquejador/neutralitzador.

5.1.2.1. Sistema enzimàtic

També és anomenat *sistema preventiu*, ja que transformen les ERO en productes menys reactius, de tal manera que es disminueix la possibilitat de formació de RLL (Segura, 2014). Dins d'aquest grup trobem la superòxid-dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) i la glutatió peroxidasa (GPx; EC 1.11.1.9), les quals es consideren la primera línia de defensa en l'àmbit enzimàtic. Altres enzims implicats són la glutatió reductasa (GR; EC 1.8.1.7), en la segona línia de defensa (figura 11) (Betteridge, 2000).

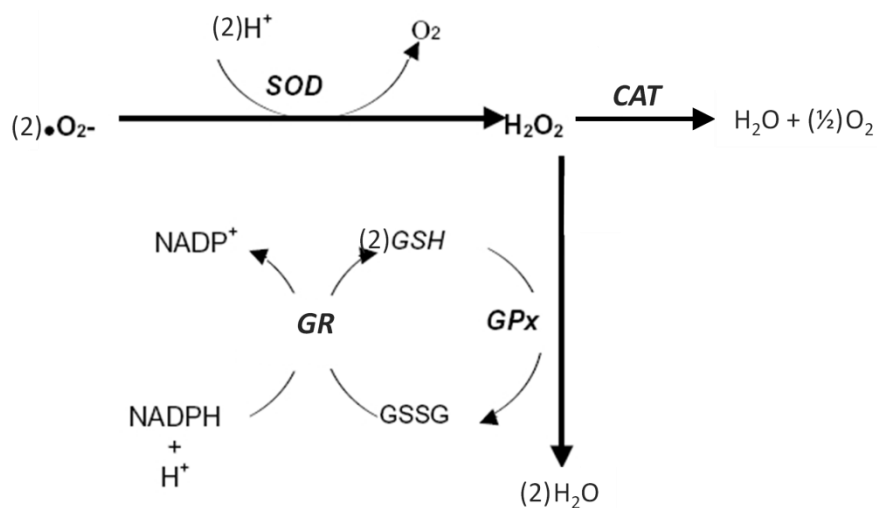


Figura 11. Sistema antioxidant enzimàtic. SOD, superòxid-dismutasa; CAT, catalasa; GPx, glutatió peroxidasa; GR, glutatió reductasa; GSH, glutatió reduït; GSSG, glutatió oxidat; $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (oxidat /reduït); $\bullet\text{O}_2^-$, anió superòxid; H_2O_2 , peròxid d'hidrogen; O_2 , oxigen; H_2O , aigua; H^+ , protó. Imatge adaptada (Hrycay i Bandiera, 2015).

La **SOD** s'encarrega de la transformació del $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 i O_2 . Presenta diferents isòmers segons la seva localització subcel·lular. Les tres isoformes de la SOD estan àmpliament expressades en els diferents teixits i són: la Cu/Zn-SOD o SOD1, citoplasmàtica; la Mn-SOD o SOD2, mitocondrial, i la EC-SOD o SOD3, extracel·lular (Fregoso Aguilar et al., 2016). Específicament, la Cu/Zn-SOD és un homodímer en què cada subunitat presenta un àtom de Cu i un de Zn. Pot estar localitzada específicament al citosol, al nucli, a l'espai intermembrana dels mitocondris o als peroxisomes, segons l'estat metabòlic de la cèl·lula (Kira et al., 2002). Per la seva banda, la Mn-SOD és un

homotetràmer que presenta un àtom de Mn a cada subunitat mentre que la EC-SOD és un tetràmer glicosilat amb una gran afinitat per l'heparina i els sulfats d'heparina (Fregoso Aguilar et al., 2016). La EC-SOD té especial rellevància en els pulmons (Al-Dalaen i Al-Qtaitat, 2014).

La **CAT** és un enzim homotetramèric en què cada subunitat presenta un grup hemo. Està situada als peroxisomes i agafa el H_2O_2 i el transforma en H_2O i O_2 .

Per la seva banda, la **GPx** s'encarrega d'eliminar tots els peròxids, tant el peròxid d'hidrogen com els lipoperòxids, usant el glutatió reduït (GSH) com a substrat. La GPx és una selenoproteïna que presenta 4 isoformes principals expressades en diferent grau segons el teixit: GPx-1 o citosòlica, ubiqua; GPx-2 o gastrointestinal, citosòlica i específica del fetge i de les cèl·lules epitelials del tracte gastrointestinal; GPx-3 o plasmàtica, extracel·lular; GPx-4 o hidroperoxidasa, unida a la membrana cel·lular (Fregoso Aguilar et al., 2016; Rahman, 2007). La GPx-1, -2 i -3 són homotetràmers que actuen sobre peròxids (d'hidrogen i lipídics) mentre que la GPx-4 és un monòmer que actua sobre els fosfolípids peroxidats i els hidroperòxids de colesterol. Actualment es coneixen quatre isoformes més de la GPx: la GPx-5, que és molt semblant a la GPx-3 i actua en l'epidídim; la GPx-6 és una selenoproteïna secretada i actua en l'epiteli olfatori; la GPx-7, que actua principalment com a sensor intracel·lular de l'homeòstasi oxidativa i també està relacionada amb l'estrès del reticle endoplasmàtic, i, recentment, la GPx-8 s'ha descrit com una proteïna de membrana molt associada al reticle endoplasmàtic (Chen et al., 2016b; Sies et al., 2017). Els teixits amb més presència de GPx són el fetge i els ronyons. A més, segons el teixit, la GPx i la CAT competeixen pel H_2O_2 (Fregoso Aguilar et al., 2016). En els testicles, per exemple, la GPx és predominant sobre la CAT (Bauché et al., 1994) i destaca la GPx-4 a causa de la gran sensibilitat dels lípids de membrana dels testicles envers a les ERO i a la peroxidació lipídica.

Per acabar, la **GR** és una selenoproteïna íntimament relacionada amb la GPx i s'encarrega d'agafar el glutatió oxidat (GSSG) i reduir-lo en dues molècules de GSH.

5.1.2.2. Sistema no enzimàtic

També és anomenat *sistema bloquejador o neutralitzador*, ja que evita les reaccions en cadena de l'oxidació en eliminar els RLL d'una espècie (Segura, 2014). Les espècies bloquejadores o neutralitzadores posseeixen un àtom d'hidrogen que els dota de poder reductor. Aquest àtom d'hidrogen és cedit als RLL, que l'incorporen al seu orbital més extern on es troba l'electró desaparellat. D'aquesta manera, els RLL es transformen en espècies no reactives i s'aturen les

possibles reaccions d'oxidació consegüents. Les espècies bloquejadores o neutralitzadores queden en estat oxidat i poden ser reduïdes, és a dir, restaurades per tornar a actuar com a antioxidant.

El principal sistema antioxidant intracel·lular de l'organisme és el **glutatió**, relacionat amb els enzims GPx i GR, anteriorment descrits. El glutatió és un tripèptid (Glu-Cys-Gly) que es pot trobar en forma reduïda (GSH) o oxidada (GSSG). Ambdues molècules més els enzims GPx i GR conformen el **cicle del glutatió**. El cicle del glutatió representa un paper clau en la defensa antioxidant enzimàtica quan la GPx degrada els peròxids i usa el GSH com a substrat donador de protons (corresponent al grup tiol de la cisteïna). Llavors el GSH es converteix en el radical GS[•], el qual s'uneix amb un altre radical GS[•] per formar el GSSG. El GSSG no presenta poder antioxidant i, per tant, la cèl·lula necessita regenerar-lo a GSH. En aquest procés de conversió actua la GR, que usa NADPH per convertir el GSSG en dues molècules de GSH i restaurar el poder reductor.

No obstant això, el GSH pot tenir moltes altres funcions: és capaç d'estabilitzar radicals HO[•] i O₂^{•-}, a banda dels peròxids; pot donar hidrògens en la reparació de l'ADN; pot reduir el radical tocoferoxil; juntament amb la glutatió S-transferasa (GST), participa en la detoxificació de xenobiòtics que posseeixin un grup electrofílic, pot conjuguar-se amb NO i alliberar-se per l'acció de proteïnes tiol o pot interaccionar amb altres proteïnes que intervenen en l'homeòstasi oxidació-reducció (Martínez Álvarez et al., 2007).

Altres antioxidants presents a l'organisme són la vitamina E (Vit E o tocoferols) i la vitamina C (Vit C o àcid ascòrbic). La Vit E és liposoluble i agafa els RLL dels àcids grassos i es converteix en el RLL tocoferoxil, menys reactiu que els RLL presents en els àcids grassos. Els RLL tocoferoxils es converteixen en α-tocoferols per l'acció de la **Vit C**. La Vit C és hidrosoluble i es transforma en el RLL àcid ascorboxil si cedeix un àtom d'hidrogen o en el àcid deshidroascòrbic si en cedeix dos. Cal destacar que les Vit E i C poden actuar sincronitzades o de manera independent. No obstant això, existeixen molts altres antioxidants a l'organisme com poden ser la melatonina, els estrògens, la bilirubina i la biliverdina, l'àcid úric, els polifenols, etc. De tots aquests, farem especial atenció a: els àcids fenòlics i polifenols, ja que el PHBA i el PHHA són àcids fenòlics i els dos metabòlits principals del n-ButP; i els estrògens, ja que els PBs són considerats DEs febles amb efecte estrogènic.

Alguns d'aquests antioxidants poden ser endògens (estrògens) i d'altres els podem obtenir de forma exògena, generalment a partir de la dieta (Vit C). Alguns dels antioxidants exògens més estudiats i coneguts són els **àcids fenòlics** i els **polifenols**. N'hi ha una gran varietat però tots tenen

en comú un anell fenòlic, o més d'un en el cas dels polifenols, capaç de cedir un àtom d'hidrogen als RLL. El fenol es converteix en el RLL fenoxil, el qual presenta una reactivitat molt petita o nul·la gràcies a l'estabilitat de l'anell fenòlic (Segura, 2014).

Els **estrògens** són antioxidants naturals. Destaquen els estrògens amb un grup hidroxil (R-OH) als anells aromàtics, ja que poden regenerar la Vit E o la 2-hidroxiestrona, inhibidora de la peroxidació lipídica (Segura, 2014).

5.2. Estrès oxidatiu en el sistema reproductor masculí

L'estrès oxidatiu pot ser un dels motius de la infertilitat masculina. Hi ha un gran nombre de factors exògens i endògens que poden generar EO en el sistema reproductor masculí i es relacionen amb problemes reproductius. En els testicles, per exemple, trobem la torsió testicular, en la qual el testicle gira sobre si mateix i comprimeix els vasos sanguinis, la qual cosa fa que no arribi la sang i s'augmenten els nivells d'ERO i de cèl·lules apoptòtiques (Asadi et al., 2017; Shiraishi et al., 2001). Aquesta malaltia pot provocar la pèrdua del procés d'espermatogènesi. També hi ha la varicocele, la qual és una dilatació de les venes de l'escrot i pot causar infertilitat (Shiraishi i Naito, 2007). Està relacionada amb nivells d'ERO elevats i dany a l'ADN, tant en els testicles com en el semen. A més, causa l'increment del flux de la sang testicular, la qual cosa fa augmentar la temperatura que, al mateix temps, està relacionada amb l'EO (Asadi et al., 2017). Una altra malaltia associada amb l'increment de la temperatura testicular és el criptorquidisme, és a dir, el no descens d'un o dels dos testicles. Altres malalties com la diabetis, l'hipertiroïdisme i les infeccions poden incrementar l'EO i afectar la funció testicular (Asadi et al., 2017). El desajustament entre les concentracions de les diverses hormones reproductives també pot generar efectes negatius sobre els sistemes antioxidants del testicle (Asadi et al., 2017). D'altra banda, substàncies exògenes, com xenobiòtics o toxines, poden estar relacionades amb l'EO testicular i la potenciació del dany en cèl·lules germinals i amb l'apoptosi (Asadi et al., 2017). L'estil de vida també pot generar EO en el testicle. El consum excessiu d'alcohol i el tabac s'han relacionat amb problemes de fertilitat.

Referent als espermatozoides, se sap que les ERO i els RLL redueixen la fertilitat espermàtica, afecten els paràmetres de mobilitat, nombre, morfologia i/o viabilitat (Saleh i Agarwal, 2002). Per exemple, l'augment en la concentració de H₂O₂ pot reduir la mobilitat espermàtica (Baker i Aitken, 2004). D'altra banda, la peroxidació lipídica pot interrompre la fluidesa i permeabilitat de les membranes i causar la pèrdua de la capacitat espermàtica per unir-se amb l'òcit i de fecundar-lo.

També s'ha vist com molts espermatozoides infèrtils presenten un augment en el nombre de trencaments en les cadenes d'ADN, els quals poden ser generats per un increment de les ERO (Bennetts i Aitken, 2005).

5.2.1. Alteracions en el sistema reproductor

Un excés d'ERO pot generar una sèrie d'alteracions en les cèl·lules de diversos òrgans i en poden afectar la funció o processos essencials. Els testicles i els espermatozoides són molt susceptibles a les ERO a causa del seu alt contingut en àcids grassos insaturats (Walczak-Jedrejowska et al., 2013). Aquests àcids grassos es poden oxidar ràpidament a causa de la peroxidació lipídica.

Tots els àcids grassos es poden peroxidar i convertir-se en espècies reactives. Així doncs, podem trobar peroxidació lipídica en els àcids grassos de les membranes cel·lulars, de lipoproteïnes o, fins i tot, de la dieta. La peroxidació lipídica està dividida en 3 etapes (figura 12) (Sanocka i Kurpisz, 2004; Segura, 2014):

- **Etapa d'iniciació.** Té lloc quan un radical hidroxil (HO^{\bullet}) reacciona amb un lípid i el converteix en un radical lipídic (L^{\bullet}). Aquest radical reacciona ràpidament amb el O_2 i formen un radical lipoperoxil (LOO^{\bullet}).
- **Etapa de propagació.** Els radicals lipoperoxil (LOO^{\bullet}) inicien una sèrie de reaccions en cadena en les quals els diversos radicals lipídics reaccionen amb els àcids grassos i generen lipohidroperòxids (LOOH) i radicals lipídics (L^{\bullet}).
- **Etapa de finalització.** Es genera quan els radicals lipoperoxil (LOO^{\bullet}) reaccionen entre si i es formen grups cetona (LO) o aldehid (LHO). La finalització de la peroxidació lipídica també es pot donar gràcies a l'acció d'un antioxidant, el qual actua i neutralitza els RLL.

Els àcids grassos més susceptibles a ser peroxidats són els poliinsaturats a causa dels dobles enllaços. Els radicals HO^{\bullet} i LOO^{\bullet} tenen la capacitat d'arrencar els àtoms d'hidrogen dels grups metilè ($\text{R-CH}_2\text{-R}'$), on els situats entre dos enllaços dobles són especialment susceptibles a l'atac del radical LOO^{\bullet} . Això és a causa que el doble enllaç debilita la força d'unió carboni-hidrogen a l'àtom de carboni adjacent (Betteridge, 2000; Segura, 2014).

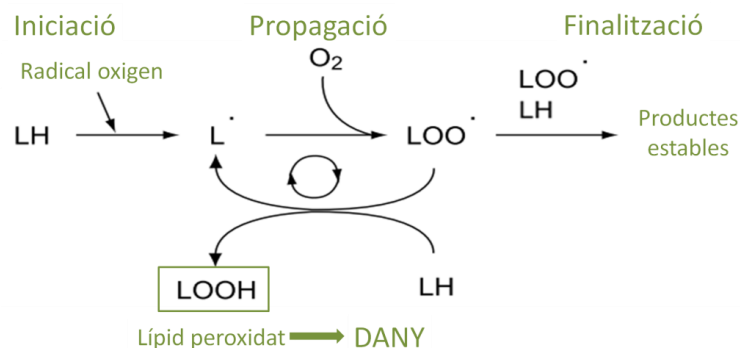


Figura 12. Esquema de la reacció en cadena de la peroxidació lipídica. LH, lípid; L•, radical lipídic; LOO•, radical lipídic peroxil; LOOH, lípid peroxidat. Imatge adaptada (Yoshikawa i Naito, 2002).

La peroxidació lipídica és un dels principals problemes tant dels testicles com dels espermatozoides envers a les ERO (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013). En les membranes pot generar canvis en la fluïdesa, augment de la permeabilitat, descens del potencial de membrana i, com a conseqüència, la seva possible fragmentació (Betteridge, 2000). La pèrdua d'integritat de la membrana cel·lular i l'augment de la permeabilitat provocarà alteracions en els processos cel·lulars, dany en l'estructura de l'ADN, generarà processos apoptòtics o l'increment d'elements traça com el calci, entre altres. Conseqüentment, es poden trobar efectes patològics en el testicle, com un procés d'espermatogènesi anormal, o en els espermatozoides com una pèrdua de la mobilitat o mutacions des del punt de vista genètic, per exemple (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

Malgrat que la peroxidació lipídica sigui un dels principals danys a causa de l'EO, no és l'únic dany que podem trobar. Per exemple, podem trobar alteracions des del punt de vista proteic o des del punt de vista genètic, les quals poden causar mutacions heretables si es donen en les cèl·lules germinals. També es pot donar la inducció del procés apoptòtic, que si afecta les cèl·lules del procés de l'espermatogènesi, pot desenvolupar azoospermia o oligospermia, alteracions que poden generar infertilitat en els mascles.

D'altra banda, s'ha descrit com altes concentracions de metalls poden causar EO tant en els testicles com en els espermatozoides. Per exemple, altes dosis de ferro incrementen les ERO i el dany oxidatiu en proteïnes, lípids i ADN. També inhibeixen les defenses antioxidants (Dobrakowski et al., 2018). El cadmi incrementa l'EO i afecta la mobilitat espermàtica i el sistema antioxidant (Adaramoye i Akanni, 2016). Per la seva banda, el plom disminueix la mobilitat i el nombre d'espermatozoides, els quals, al mateix temps, incrementen la producció de les ERO i la peroxidació

lipídica (Turner i Lysiak, 2008). L'excés de manganès pot augmentar la peroxidació lipídica i afectar la mobilitat espermàtica (Wan et al., 2019). Tant el zinc, el coure, el manganès i el seleni estan estretament relacionats amb el sistema antioxidant enzimàtic i la seva funcionalitat, de tal manera que l'alteració en les seves concentracions pot generar una defensa antioxidant defectiva. A més, el zinc té un paper molt important en el procés d'espermatogènesi i en la lluita contra el dany testicular (Fallah et al., 2018). L'excés d'ERO pot generar alteracions en el calci, element relacionat amb la homeòstasi cel·lular i l'espermatogènesi, entre altres implicacions cel·lulars.

5.2.2. Sistemes antioxidants en els testicles

Els testicles presenten alta susceptibilitat a les ERO per diversos motius: la competència entre les cèl·lules per aconseguir l'oxigen, el qual està en una tensió baixa a causa de la pobre vascularització testicular per crear un microambient més protegit de les ERO; i la seva elevada ràtio de divisió cel·lular, que implica grans processos d'obtenció i consum d'energia per part dels mitocondris (Yuksel et al., 2012). A més, són altament susceptibles a la peroxidació lipídica a causa del seu elevat contingut en àcids grassos poliinsaturats a les membranes cel·lulars (Bauché et al., 1994). Les ERO es poden generar per l'acció d'una gran varietat d'enzims com la xantina oxidasa i la NADPH oxidasa o el citocrom P450 (Aitken i Roman, 2008). A més, els mitocondris també són un punt clau en la generació d'ERO a causa de la seva cadena de transport d'electrons. S'observa, doncs, com la generació d'ERO en els testicles ja està donada per les seves funcions fisiològiques. A causa de la seva importància biològica i de la susceptibilitat que tenen envers les ERO, els testicles estan dotats d'un bon sistema antioxidant per evitar possibles danys o mutacions al material genètic, en especial en les cèl·lules germinals.

El sistema antioxidant dels testicles varia segons en quin tipus cel·lular ens centrem. Per exemple, les cèl·lules de Sertoli presenten elevats nivells de SOD, GPx, GST, GR i GSH. A més, aquestes cèl·lules són capaces de fagocitar les restes cel·lulars de cèl·lules germinals i el citoplasma residual que s'allibera de les espermàtides durant l'espermatogènesi (Bauché et al., 1994). Les cèl·lules peritubulars presenten un sistema antioxidant molt semblant a les cèl·lules de Sertoli mentre que les cèl·lules germinals no. Aquestes últimes tenen una gran activitat SOD però presenten molt poca activitat GPx, GR i GST, la qual cosa les fa molt susceptibles a les ERO i, com a conseqüència, a possibles mutacions heretables (Bauché et al., 1994). No obstant això i de forma genèrica, els testicles presenten elevats nivells de SOD, GPx, GR i GSH, així com GST. De manera específica, els testicles presenten la SOD citosòlica, la mitocondrial i una forma especial de la SOD extracel·lular

produïda per les cèl·lules de Sertoli i germinals (Aitken i Roman, 2008). Respecte a la GPx, la isoforma majoritària és la GPx-4, que s'expressa sobretot en les cèl·lules de Leydig i en les espermatides per protegir-les, essencialment, de la peroxidació lipídica. Com s'ha comentat anteriorment, els testicles són altament susceptibles a la peroxidació lipídica a causa de la seva composició molecular i la GPx-4 és molt afí a tots els hidroperòxids de membrana. Finalment, la CAT és molt minoritària en els testicles (Turner i Lysiak, 2008).

A banda de tot el sistema antioxidant enzimàtic, els testicles posseeixen també una gran varietat de molècules antioxidants. En primer lloc es troben les Vit E i C, les quals són essencials per a l'espermatogènesi (Aitken i Roman, 2008). La Vit E té un paper essencial en el manteniment de l'espermatogènesi en estar en altes concentracions en les cèl·lules de Sertoli i en els espermatòcits. Per la seva banda, la Vit C té un paper de suport a l'espermatogènesi, ja que intervé en la reducció del radical α -tocoferoxil. Un altre element essencial és el zinc (Zn). El Zn pren part en diversos punts: és necessari per a l'acció de certs enzims antioxidants, com la SOD; protegeix els grups sulfhidril, i interfereix en la peroxidació lipídica i la perjudica (Aitken i Roman, 2008). La melatonina també presenta un paper important en la protecció dels testicles envers a l'EO, ja que pot actuar com la Vit C, és a dir, pot oxidar fins a dos electrons, i pot travessar la BTB per protegir les cèl·lules germinals. Finalment, trobem una isoforma específica del citocrom c que actua sobre el H_2O_2 i els processos d'apoptosi de cèl·lules germinals danyades (Aitken i Roman, 2008).

5.2.3. Sistemes antioxidants en els espermatozoides

Cal destacar que les ERO en els espermatozoides tenen un paper important si es troben en petites concentracions, ja que permeten capacitar els espermatozoides per a la fecundació. Els espermatozoides poden generar ERO, essencialment, per l'acció de la NADPH oxidasa, situada a la membrana espermàtica, i de la NADH-dependent oxidoreductasa, situada als mitocondris (Agarwal i Prabakaran, 2005). No obstant això, una de les principals fonts en la generació de les ERO en els espermatozoides són els leucòcits. Els leucòcits, sota condicions fisiològiques, generen 1000 vegades més ERO que els espermatozoides (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013). Aquestes concentracions elevades d'ERO per part dels leucòcits són importants per lluitar contra les infeccions i la inflamació. Malgrat tot, la disrupció en la homeòstasi, genera dany a les cèl·lules i, en aquest cas concret, a les cèl·lules germinals associades a l'espermatogènesi i als mateixos espermatozoides.

Els espermatozoides són molt sensibles i estan més exposats a les ERO que les cèl·lules germinals del testicle. La seva defensa antioxidant és menys eficient que la d'altres cèl·lules a causa del seu citoplasma limitat, que fa que tinguin un contingut molt baix d'enzims antioxidants i de GSH. A més, la membrana espermàtica és molt sensible a la peroxidació lipídica a causa del seu contingut elevat en àcids grassos poliinsaturats (Asadi et al., 2017; Bauché et al., 1994). És interessant assenyalar que la membrana plasmàtica al voltant de l'acrosoma i la cua presenta una defensa antioxidant insuficient a causa de la seva particular morfologia (Asadi et al., 2017). Així doncs, a causa d'una defensa antioxidant poc eficaç, la màxima protecció dels espermatozoides es dona gràcies al semen i a tots els antioxidants que hi són presents (Showell et al., 2011). El semen és ric en enzims antioxidants (SOD, CAT i GPx) i en molècules antioxidants com els glutatons, la taurina, el piruvat, les Vit A, E i C, l'albumina i la carnitina (Asadi et al., 2017).

5.3. Estrès oxidatiu i disruptors endocrins

Els disruptors endocrins també estan relacionats amb l'augment de l'EO. Com s'ha comentat amb anterioritat, els DEs es comporten de manera semblant a les hormones que imiten, ja que es poden unir al receptor o a proteïnes associades en les vies de senyalització hormonal. Els seus mecanismes d'acció poden ser molt diversos però s'han relacionat amb l'EO i la generació d'ERO i RLL, les quals estant relacionades amb un gran nombre d'alteracions en l'àmbit bioquímic i en síndromes o amb malalties des del punt de vista fisiològic. En el camp bioquímic destaquen l'oxidació de proteïnes, lípids i àcids nucleics i les disfuncions cel·lulars o l'increment de cèl·lules apoptòtiques. En l'àmbit fisiològic, trobem una gran varietat de malalties o síndromes com poden ser la diabetis, obesitat, càncer, infeccions, processos inflamatoris, cataractes, degeneració macular senil, artritis, malalties cardiovasculars com l'ateroesclerosi, problemes reproductius, problemes en el sistema nerviós, entre moltes altres (Maqbool et al., 2016; Segura, 2014).

Així doncs, veiem com els DEs no generen solament alteracions en el sistema endocrí sinó que també generen altres mecanismes perjudicials en l'organisme com ara la disrupció del sistema oxidant-antioxidant (Neier et al., 2015).

5.3.1. Generació d'estrès oxidatiu a causa de l'exposició als parabens

Els parabens també poden estar involucrats en processos d'EO. Hi ha diversos estudis sobre els PBs i la generació d'EO *in vitro*, *in vivo* i humà.

In vitro, s'observa de forma general l'augment de l'EO i de l'apoptosi cel·lular després de l'exposició als PBs. No obstant això, aquests efectes depenen molt del compost concret donat. Kizhedath et al. (2019) han tractat dos tipus de línies cel·lulars: les d'hepatocarcinoma i les de fibroblast dèrmics d'humans neonatals. Aquestes línies cel·lulars van ser tractades amb MetP i n-ButP a concentracions entre 5 i 1000 µM. El MetP no va mostrar cap afectació sobre ambdues línies cel·lulars mentre que el n-ButP va mostrar la disminució de la viabilitat cel·lular en ambdues línies cel·lulars i la depleció del GSH, que suggeria EO. Anteriorment, Nakagawa i Moldéus (1998) havien descrit la depleció del GSH en hepatòcits aïllats de rata a causa del n-ButP. El 2018 Yang et al. van estudiar l'efecte del n-ButP sobre la proliferació cel·lular i l'apoptosi en cèl·lules humanes de tropoblast. Van trobar que el n-ButP inhibia la proliferació i induïa a l'apoptosi i a l'estrès en el reticle endoplasmàtic, a banda de produir ERO intracel·lulars, l'augment del Ca²⁺ i la despolarització de la membrana mitocondrial. D'altra banda, Handa et al. (2006) van tractar queratinòcits de la pell humans amb MetP. Com que la màxima exposició als PBs es dona per via dèrmica, aquests autors volien veure si la llum del sol podia generar alteracions en el MetP i, consegüentment, aquest podia ocasionar dany a les cèl·lules. Van exposar les cèl·lules a raigs UVB i van observar com s'incrementava la mort cel·lular, la peroxidació lipídica, la producció de NO i l'EO.

Centrant-nos en els estudis realitzats *in vivo*, també mostren l'increment de l'EO i de l'apoptosi a causa de l'exposició als PBs. Shah i Verma (2011) van tractar oralment ratolins amb n-ButP durant 30 dies i van observar l'augment de la peroxidació lipídica, la disminució de l'activitat GPx i de la concentració de GSH en el fetge, efectes que mostren l'increment de l'EO a causa de l'exposició al n-ButP. Recentment han sorgit estudis realitzats en altres models animals, com en peixos. Silva et al. (2018) van tractar la tilàpia del Nil (*Oreochromis niloticus*) amb MetP, EtP, n-ProP, n-ButP, BenzP i una mescla de MetP i n-ProP durant 6 o 12 dies. Aquests autors van observar l'augment de l'activitat dels enzims antioxidants al fetge i les brànquies, la qual cosa suggeria l'adaptació per part de la tilàpia del Nil contra l'EO a causa de l'efecte dels PBs. Altres grups de recerca van tractar embrions de peix zebra (*Danio rerio*): Ateş et al. (2018) van estudiar l'efecte del MetP sobre els embrions i van trobar-hi l'augment de la peroxidació lipídica i de l'apoptosi i la disminució de l'activitat GST i de la concentració de NO; mentre que Brown et al. (2018) van mirar l'efecte del n-ButP sobre les cèl·lules pancreàtiques dels embrions i van veure alteracions en els nivells d'expressió gènica dels gens implicats amb la GR i en la síntesis del GSH. Altres autors han avaluat els efectes tòxics dels PBs en organismes aquàtics (Brausch i Rand, 2011; Comeche et al., 2017;

Yamamoto et al., 2011). Aquest increment recent d'estudis en models d'animals aquàtics deriva del problema ambiental que poden generar les traces de PBs eliminades al mar, rius, aigües subterrànies o en fangs i sòls. Aquest problema té l'origen, essencialment, en els residus de les indústries o de la llar (orina, pols, aliments o productes farmacèutics...) que poden contenir traces de PBs, els quals van a plantes de tractament d'aigües residuals. Un cop finalitzat el tractament, s'aboquen al medi ambient, on entren en contacte amb els diversos organismes, entre els quals els animals aquàtics.

Respecte a altres models d'experimentació, Chen et al. (2016a) van tractar la *Drosophila melanogaster* i van trobar que els PBs podien incrementar el dany oxidatiu en diferents macromolècules. A més, l'efecte del n-ProP sobre el *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) va ser estudiat per García-Espiñeira et al. (2018). Aquests autors van trobar que el n-ProP feia augmentar l'expressió gènica de la SOD i la CAT, cosa que generava efectes adversos en el creixement i la reproducció del *C. elegans*.

No obstant això, altres autors també han descrit efectes antioxidants per part dels PBs. Kopalli et al. (2013) van veure com el MetP podia inhibir la peroxidació lipídica en cèl·lules neuronals de ratolí, i Popa et al. (2014) van tractar oralment rates amb bisfenol A (BPA) i MetP i van observar com el PHBA era capaç d'agafar els radicals hidroxils i, consegüentment, inhibir la peroxidació lipídica en plasma.

Finalment, estudis en humans mostren la relació entre els PBs excretats per l'orina i biomarcadors d'EO en dones embarassades (Kang et al., 2013; Watkins et al., 2015).

5.3.1.1. Estrès oxidatiu en el sistema reproductor masculí a causa de l'exposició als parabens

Els disruptors endocrins poden estar involucrats en l'augment de la infertilitat perquè causen una gran varietat d'anormalitats en el sistema reproductor. Com s'ha vist anteriorment, un dels possibles mecanismes adversos és l'augment de les ERO. Per exemple, l'espermatogènesi es dona en els túbuls seminífers i és altament sensible a l'EO. La generació d'ERO sota condicions fisiològiques és positiva en la regulació del procés, però el desajustament en aquestes espècies reactives pot generar la pèrdua del procés, anormalitat en els espermatozoides o dany en l'ADN, entre d'altres. Tal com s'ha comentat abans, els sistemes antioxidants del testicle, i també dels mateixos espermatozoides, hi tenen un paper clau, malgrat que poden no ser suficients envers l'EO generat a causa de l'acció d'un DE. Molts autors han relacionat els problemes de fertilitat o

anormalitats en l'aparell reproductor causats per DEs amb l'augment de l'EO (Kheradmand et al., 2009; Sedha et al., 2015; Yuksel et al., 2012).

En relació amb els PBs, s'han dut a terme investigacions per relacionar l'EO en els testicles o en els espermatozoides d'organismes exposats a PBs. Actualment, el nombre d'estudis amb aquest objectiu és limitat. Samarasinghe et al. (2018) van mirar en espermatozoides humans quin efecte podrien causar el MetP, en ser el més usat en lubricants vaginals, i també una mescla de PBs (MetP, EtP, n-Prop, n-ButP) en diferents concentracions comercials utilitzades en lubricants vaginals. Van observar com el MetP inhibia la mobilitat espermàtica a les 2 i 5 hores de l'exposició, afectava la viabilitat, augmentava la generació d'ERO i l'oxidació en l'ADN. D'altra banda, la mescla de PBs també estimulava la generació d'ERO en l'àmbit mitocondrial i citosòlic i inhibia la mobilitat i viabilitat espermàtica de manera dosi-dependent.

D'altra banda, Riad et al. (2018) van analitzar l'efecte del n-ButP en rates de 21 dies d'edat. Aquests autors van donar 50 mg/kg/d de n-ButP durant 8 setmanes via oral i van trobar alteracions en els àmbits espermàtic i hormonal així com l'augment de la peroxidació lipídica i la disminució de l'activitat SOD i CAT en els testicles que indiquen EO.

Com es pot observar, hi ha un cert nombre d'estudis que relacionen l'exposició dels PBs amb l'EO. La majoria n'observa l'augment després de l'exposició als PBs. No obstant això, alguns estudis també mostren efectes antioxidants. Cal, doncs, realitzar més estudis en aquest àmbit per poder establir de manera més acurada els mecanismes oxidants i antioxidants per part dels PBs.

HIPÒTESI I

OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

La preocupació envers l'ús excessiu de DEs i compostos similars als DEs ha anat en augment amb el temps. Els DEs engloben una gran quantitat de substàncies exògenes al nostre organisme que poden interactuar en molts processos. Aquestes substàncies s'usen cada vegada més en una gran varietat de productes: des de productes farmacèutics fins a usos industrials passant pels productes per a infants o per a l'alimentació. Conseqüentment, els humans hi estem exposats per múltiples vies i fonts. Entre els DEs, es troben els PBs, els quals es classifiquen com a DEs febles. Els PBs s'usen en una gran varietat de productes des dels anys vint i estan considerats com a compostos segurs per als humans. No obstant això, s'ha publicat una gran quantitat d'estudis que posen en dubte la innocuïtat i seguretat en humans i en altres organismes. Diversos autors han descrit efectes estrogènics deguts als PBs que poden derivar en problemes de fertilitat tant en homes com en dones; reaccions al·lèrgiques, sobretot pel que fa a la dermis; una possible relació amb el càncer de mama; o, fins i tot, afectacions en animals marins a causa de la seva presència en aigües i fangs residuals, entre altres efectes adversos.

D'aquesta preocupació social creixent envers els PBs i de la necessitat de nous estudis que ens aportin noves dades toxicològiques en sorgeix aquesta tesi doctoral, que presenta com a finalitat donar resposta a la mancança de dades experimentals i toxicològiques en rates mascle tractades subcutàniament. D'aquestes consideracions en sorgeix la hipòtesi següent:

Els parabens són disruptors endocrins, l'exposició dels quals pot generar alteracions en el sistema endocrí i reproductor de l'organisme que hi entra en contacte, tant en mascles com en femelles. A causa del seu potencial estrogènic, el n-butilparabèn pot provocar alteracions en el sistema reproductor masculí, així com en la producció i maduració d'espermatozoides. A més, com que és una substància exògena amb capacitat estrogènica, pot ocasionar estrès oxidatiu al testicle.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

Hi ha un gran nombre d'investigacions que avaluen la toxicitat dels PBs en el sistema reproductor. No obstant això, aquests estudis se centren generalment en la via oral i cap estudi està realitzat subcutàniament en mascles joves de rata. D'aquest escenari en sorgeixen els objectius d'aquesta tesi doctoral:

Objectiu general:

- Avaluar els potencials efectes tòxics del n-ButP en el sistema reproductor de mascles joves de rata tractats subcutàniament a diferents dosis de n-ButP durant un cicle sencer d'espermatogènesi. Estudiar si els possibles efectes des del punt de vista espermàtic i testicular són deguts a l'estrès oxidatiu als testicles.

Objectius específics:

- Estudiar els efectes del n-ButP sobre l'estat bioquímic general, l'efecte del n-ButP sobre la resposta hormonal i l'activitat de l'enzim paraoxonasa 1 (PON1) en sèrum.
- Avaluar els paràmetres espermàtics de mobilitat, morfologia, viabilitat, maduresa, nombre d'espermatozoides, així com el nombre d'espermàtides resistents a la homogeneïtzació.
- Realitzar estudis histopatològics dels òrgans sexuals i sexuals accessoris, així com del fetge, per estudiar els possibles efectes adversos deguts al n-ButP des del punt de vista histològic.
- Dissenyar un model farmacocinètic basat en fisiologia (*Physiologically-based pharmacokinetic*, PBPK) per relacionar l'estrès oxidatiu en els testicles amb els perfils de temps-concentració del n-ButP durant tot el tractament.
- Determinar les concentracions de diversos biomarcadors associats amb l'estrès oxidatiu i els sistemes antioxidants en els testicles.
- Estudiar les possibles alteracions en el sistema antioxidant enzimàtic en els testicles de rates joves tant en l'àmbit d'activitat enzimàtica com d'expressió proteica.
- Determinar els nivells de cadmi, calci, cobalt, coure, ferro, magnesi, manganès, plom, seleni i zinc en els testicles i relacionar-los amb les possibles alteracions reproductives i l'estrès oxidatiu.
- Alternativament, estudiar si el vehicle utilitzat per administrar n-ButP pot causar efectes per si sol en el sistema reproductor de mascles joves de rata, així com alteracions en els sistemes antioxidants i en els elements traça en els testicles.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

RESULTATS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

TREBALL 1

Effects on the reproductive system of young male rats of subcutaneous exposure to n-butylparaben.

Tània Garcia¹, Elga Schreiber¹, Vikas Kumar, Raju Prasad, Juan J. Sirvent, José L. Domingo, Mercedes Gómez*

¹ Els dos primers autors contribueixen equitativament en aquest treball.

Food and Chemical Toxicology, 106 (2017): 47-57. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.031

RESUM:

L'objectiu d'aquest estudi era determinar si una exposició subcutània *in vivo* de n-butilparabèn (n-ButP) durant un cicle sencer d'espermatogènesi podria ser perjudicial per al sistema reproductor de mascles joves de rata. El n-ButP va ser administrat per via subcutània a les dosis de 0, 150, 300 i 600 mg/kg/d dissolt en el vehicle (oli de cacauet). Es van examinar el pes corporal i el pes dels òrgans, l'excreció del n-ButP, els paràmetres bioquímics, el nombre d'espermatozoides i d'espermàtides, i la mobilitat, viabilitat, maduresa i morfologia espermàtiques. Els resultats van mostrar que el n-ButP no indueix canvis dosi-resposta en els paràmetres bioquímics, però sí que es va trobar la disminució significativa dels triacilglicèrids (TAG) a causa del vehicle. Addicionalment, no es van observar efectes del n-ButP respecte al guany de pes corporal o al pes relatiu dels òrgans. En referència als òrgans sexuals, el pes relatiu de la pròstata va augmentar significativament en la dosi alta de n-ButP. D'altra banda, es va trobar l'augment significatiu de la morfologia anormal dels espermatozoides a causa de l'exposició al n-ButP, juntament amb diverses alteracions en la histopatologia dels òrgans sexuals. Els resultats indiquen que l'exposició subcutània al n-ButP en rates mascle joves va induir efectes tòxics en el sistema reproductor, els quals podrien afectar la capacitat de fertilització dels animals.

Paraules clau: n-butilparabèn (n-ButP); rates mascle; exposició subcutània; esperma; toxicitat reproductiva

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

TREBALL 2

Oxidative stress in testes of rats exposed to n-butylparaben.

Elga Schreiber, Tània Garcia, Raju P. Sharma, Margarita Torrente, José L. Domingo, Mercedes Gómez

Food and Chemical Toxicology, 131 (2019): 110573. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110573

RESUM:

L'objectiu d'aquest estudi era determinar si té lloc un desequilibri de l'estrès oxidatiu en testicles de rata després d'una exposició al n-butilparabèn (n-ButP). Es van tractar subcutàniament mascles joves de rata *Sprague-Dawley* amb n-ButP, dissolt en oli de cacauet com a vehicle, a 0 (control-oli), 150, 300 i 600 mg/kg/d durant un cicle d'espermatogènesi (57 dies). També es va incloure un grup control sense vehicle. Es van mesurar les activitats dels enzims antioxidants (superòxid-dismutasa, catalasa, glutatió reductasa i glutatió peroxidasa) i la concentració dels glutatons reduïts i oxidats en els testicles. També es van avaluar la peroxidació lipídica i les concentracions de H₂O₂. Els resultats mostren l'increment de l'estrès oxidatiu en els grups tractats amb l'oli, exceptuant la dosi de 600 mg/kg/d, i suggereixen estrès oxidatiu a causa de l'oli de cacauet. Es va suggerir un possible efecte antioxidant a causa del n-ButP i els seus metabòlits a 600 mg/kg/d, ja que és l'únic grup que no mostra estrès oxidatiu. També es va observar l'increment de les concentracions de calci en els testicles. D'altra banda, es va dissenyar un model farmacocinètic basat en fisiologia (*Physiologically-based pharmacokinetic*, PBPK) i es van simular les concentracions del n-ButP en el plasma i en els testicles. La concentració màxima (C_{max}) en testicles es va trobar lleugerament superior a la del plasma. Els resultats presents indiquen que l'oli de cacauet pot causar estrès oxidatiu, mentre que les dosis altes de n-ButP poden actuar com agent antioxidant en els testicles.

Paraules clau: n-butilparabèn (n-ButP); oli de cacauet; estrès oxidatiu; testicles; rates

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

DISCUSSIÓ

GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

Els parabens són compostos químics exògens als humans que s'usen en una gran varietat de productes com són els cosmètics, productes d'higiene personal, productes farmacèutics o aliments. Una gran quantitat d'estudis toxicològics han trobat que els PBs presenten un cert potencial estrogènic i/o antiandrogènic, el qual varia segons de quin èster concret dels PBs es tracti i de la via d'exposició (Routledge et al., 1998). En els últims anys i com a conseqüència del creixent interès envers als PBs i als seus possibles efectes adversos, ha sorgit una gran varietat d'estudis, tant *in vitro* com *in vivo*, per elucidar els efectes tòxics en el sistema endocrí i reproductor. Diversos autors han descrit afectacions en els àmbits hormonals i, també, en paràmetres espermàtics en mascles de rata o ratolí (Guerra et al., 2017; Oishi, 2002a, 2002b; Riad et al., 2018) i d'altres han trobat efectes en femelles com alteracions en el pes dels òrgans sexuals o a la gestació, entre d'altres (Vo et al., 2010).

En el nostre treball, s'ha testat el n-ButP en tenir un dels potencials estrogènics més elevats i perquè s'usa actualment en productes per als humans, sobretot en productes farmacèutics. Una sèrie d'estudis han mostrat que el n-ButP pot generar efectes adversos en el sistema reproductor de mascles de rates i ratolins (Boberg et al., 2016; Oishi, 2002a; Riad et al., 2018). En aquesta tesi doctoral, l'interès recau en els possibles efectes que el n-ButP, administrat per via subcutània, podria generar sobre mascles de rata sexualment immadurs, d'uns 45 dies d'edat, ja que en aquesta edat comença a donar-se el primer cicle d'espermatogènesi. Hi ha una gran varietat d'estudis del n-ButP, i altres PBs, en rates i ratolins tractats per via oral però no hi ha estudis en mascles de rata sexualment no madurs tractats per via subcutània. Cal destacar que la via subcutània, així com la dèrmica, són rellevants en els PBs, ja que la màxima exposició humana a ells és per mitjà de cosmètics i productes d'higiene personal (Soni et al., 2005).

Les dosis de n-ButP escollides van ser de 150, 300 i 600 mg/kg/d basant-nos en la literatura (Kim et al., 2015). L'ús total diari de cosmètics i productes d'higiene personal que contenen PBs s'ha assumit a 10 g/d (CIR, 2008; SCCS, 2013) i el màxim autoritzat per PBs de cadena curta és del 0,4% (4 mg/g). Tenint en compte un pes mitjà de 60 kg/persona, l'exposició diària màxima als PBs és de 0,67 mg/kg/d. La Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS, 2013) exposa que les rates són un model fluïx per extrapolar els danys tòxics en una rata generats a una concentració determinada als humans, ja que les rates presenten una capacitat metabòlica molt més elevada i hidrolitzen els PBs a una velocitat més gran (Prusakiewicz et al., 2007). Per això, l'equivalent a una exposició de 10 mg/kg en un ésser humà, la IDA recomanada en aliments (EFSA, 2004 [accés el 28/04/2019]), és de

100 vegades més en una rata, és a dir, una concentració de 1000 mg/kg. Tenint en compte tots aquests factors, Kim et al. (2015) van aplicar un factor d'incertesa de 300 (10 d'animal a humà, 10 d'humà a humà i 3 com a factor modificador per l'ús de dades subagudes) i es va establir una dosi de 200 mg/kg/d, tant per al iProP i el iButP (PBs d'estudi per aquests autors) com a concentració màxima diària. Aquests autors van determinar la dosi alta 3 vegades més gran (600 mg/kg/d) que la concentració màxima diària, dosi que ha estat escollida com la dosi alta d'aquest treball. No obstant això, l'ús dels PBs usats per Kim et al. (2015) en cosmètics i productes d'higiene personal ha estat prohibit en la UE (Fransway et al., 2019a). Per la seva banda, el n-ButP presenta una concentració màxima acceptada del 0,19% en cosmètics i productes d'higiene personal (Darbre i Harvey, 2014); per aquest motiu la nostra dosi alta és d'unes 6 vegades superior al màxim acceptat.

Com a conseqüència de la poca solubilitat del n-ButP en solucions aquoses, també es va realitzar un grup control tractat amb el vehicle (en aquest cas l'oli de cacauet), a part d'un control sense vehicle. Malgrat que l'oli de sèsam, de blat de moro i de cacauet hagin estat àmpliament usats com a vehicle en estudis toxicològics sobre els efectes estrogènics o androgènics de diferents compostos (Yamasaki et al., 2001), els grups control amb vehicle i control sense vehicle es van afegir per determinar si l'oli de cacauet per si mateix podia generar alteracions des del punt de vista reproductor en els mascles.

La via d'administració subcutània està considerada poc dolorosa per a les rates i òptima en cas de voler administrar substàncies insolubles mitjançant un vehicle oliós, durant períodes relativament llargs i quan la substància presenta una absorció difícil, com en el nostre cas (Nebendahl, 2000). Aquesta via presenta el problema de generar acumulacions subcutànies del vehicle, les quals poden generar alteracions a la pell. En el nostre estudi, es va administrar un volum de 0,5 mL del vehicle o el vehicle + n-ButP a la dosi corresponent al coll i a la zona inguinal, zones recomanades per a l'administració subcutània. Alguns mascles van mostrar certes acumulacions d'oli sota la pell a la zona del coll. No obstant això, no es van observar altres signes de toxicitat.

Per entendre els possibles efectes que s'han trobat en l'estudi, és important saber la metabolització i l'eliminació dels compostos subministrats subcutàniament. L'oli de cacauet es detoxifica principalment en el fetge i s'elimina entre les 72 i 120 h posterior a l'administració, segons la via d'administració, la quantitat d'oli subministrat, l'estat de l'organisme, entre d'altres (Braun i Cohen, 2015). Pel que respecta al n-ButP, es va simular un model PBPK per a les tres dosis del n-ButP basat

en el model d'Aubert et al. (2012). Aquest model mostra el temps de lliurament, distribució i permanència en el plasma i en els testicles. La concentració màxima (C_{max}) mostra una corba dosi-dependent i és lleugerament superior en els testicles respecte al plasma en totes les dosis. La C_{max} superior en el teixit que en plasma és a causa del volum, flux sanguini i, sobretot, coeficient de partició del testicle. No obstant això, el model PBPK mostra com el percentatge de n-ButP que arriba és molt inferior a la dosi subministrada, tant als testicles com al plasma, i és d'un 10% del total subministrat en el plasma. Alguns autors ja han descrit que un cop els PBs són absorbits, es metabolitzen ràpidament en PHBA i PHHA, malgrat que una petita fracció no serà metabolitzada (Abbas et al., 2010; Moos et al., 2016). Respecte a l'eliminació, es veuen perfils similars tant en el plasma com en els testicles i a les 48 hores és completament eliminat. Els nostres resultats mostren que el n-ButP va ser excretat a través de l'orina de manera dosi-dependent com a PHBA i PHHA, i el PHHA és el principal producte de degradació excretat a causa de la baixa solubilitat del n-ButP, tal com va ser descrit anteriorment en altres estudis (Moos et al., 2016). Tanmateix, també es detecten petites quantitats de n-ButP a l'orina, ja que els PBs, i especialment els de cadena alquil llarga, no es metabolitzen completament (Aubert et al., 2012).

Un cop finalitzat l'estudi, no es va trobar cap alteració en el pes corporal final i el guany de pes corporal a causa del n-ButP, però sí la disminució del guany de pes corporal a causa de l'oli de cacauet en el grup control-oli respecte al grup control. Alguns autors també van observar que no hi havia diferències respecte al pes corporal o al guany del pes corporal a causa del n-ButP (Hoberman et al., 2008; Taxvig et al., 2008). D'altra banda, veiem com el consum del menjar disminueix en els grups tractats amb oli de cacauet, exceptuant la dosi de 600 mg/kg/d. Se sap que l'oli de cacauet subministrat per via oral ajuda a perdre pes i a disminuir la gana (DrugBank, 2019 [accés el 21/06/2019]). Finalment, el pes del fetge total i relatiu es va veure disminuït a causa de l'oli de cacauet. Contradictòriament als nostres resultats, Vo et al. (2010) van veure l'augment del pes del fetge en femelles peripuberals a causa de l'exposició oral al n-ButP, dissolt en oli de blat de moro. Aquests autors suggereixen que l'augment en el pes del fetge pot ser degut a un efecte tòxic general per part del n-ButP com a xenobiòtic o a un efecte estrogènic. D'altra banda, suggereixen que l'increment o la disminució dels pes dels òrgans pot ser a causa de diversos mecanismes d'acció.

Respecte als diferents paràmetres bioquímics usats com a indicadors bàsics de l'estat general de l'animal, observem la disminució significativa de la concentració dels triacilglicèrids (TAG) a causa

de l'oli de cacauet en tots els grups tractats amb el vehicle respecte al grup control. Kris-Etherton et al. (1999) van observar com una dieta alta en àcids grassos monoinsaturats produeix la reducció significativa de la concentració de TAG. Sabem que l'oli de cacauet és ric en àcids grassos insaturats, tant monoinsaturats com poliinsaturats (Carrín i Carelli, 2010). Addicionalment, s'ha demostrat com el consum d'oli de cacauet disminueix els nivells de colesterol total de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) (Ghadimi Nouran et al., 2010; Kris-Etherton et al., 2001; Li et al., 2009). No obstant això, no s'han vist alteracions dels paràmetres bioquímics en sèrum a causa de l'exposició al n-ButP.

Amb la finalitat d'estudiar les possibles alteracions en el sistema reproductor a causa del potencial estrogènic del n-ButP, en el treball 1 es van analitzar la concentració de testosterona circulant i els paràmetres espermàtics que determina l'OMS: mobilitat, viabilitat, morfologia i nombre d'espermatozoides (WHO, 2010). A més, nosaltres vam analitzar el nombre d'espermàtides resistents a l'homogeneïtzació, la maduresa dels espermatozoides i la histopatologia dels òrgans sexuals (testicles, epidídim, pròstata i vesícula seminal).

S'ha vist com els compostos estrogènics poden actuar en el sistema reproductor masculí i inhibir la testosterona per part de les cèl·lules de Leydig, entre altres efectes (Knez, 2013). No obstant això, en el nostre estudi no trobem alteracions en la concentració de testosterona en sèrum ni per part del DE ni per part del vehicle. Oishi (2004) tampoc va trobar alteracions en la concentració de testosterona en rates. Contradictòriament, alguns estudis mostren el descens de la testosterona en sèrum (Hoberman et al., 2008) i d'altres un augment (Guerra et al., 2017). És conegut que la testosterona és necessària per a processos com l'espermatogènesi (OECD, 2008), i nosaltres hem observat certes alteracions en els àmbits espermàtics i histopatològics que podrien indicar toxicitat reproductiva com es comentarà posteriorment. Se sap que la concentració de testosterona en testicle és la responsable de l'espermatogènesi i que és 100 vegades més gran que la concentració de testosterona circulant (OECD, 2008). Així doncs, caldria determinar la concentració de testosterona en teixit, específicament en testicle, ja que la concentració mesurada en el nostre estudi solament podria mostrar de manera indirecta i lleu aquestes possibles alteracions reproductives.

El recompte del nombre d'espermàtides resistents a l'homogeneïtzació és un paràmetre que permet avaluar la toxicitat d'un agent químic en l'espermatogènesi, malgrat que el descens en ell

no vol dir necessàriament un efecte tòxic per part d'un químic exogen sobre les cèl·lules germinals. La toxicitat es podria donar sobre les cèl·lules de Sertoli, les de Leydig o en l'eix HT-HF-G, que equivaldria a una alteració dels nivells hormonals encarregats de l'espermatogènesi i, per tant, aquesta seria afectada de forma secundària. En canvi, l'augment en el nombre d'espermàtides resistents a l'homogeneïtzació podria significar retenció d'espermàtides en el testicle, és a dir, retardament de la espermiació que es pot analitzar de manera histopatològica (Hood, 2011). En el nostre cas, no hi ha diferències en el nombre d'espermàtides resistents a la homogeneïtzació en els grups tractats amb n-ButP respecte al grup control-oli, resultats que suggereixen que el n-ButP no hi presenta efectes adversos. No obstant això, mitjançant talls histopatològics de testicle sí que es va observar la retenció d'espermàtides, la qual va ser classificada com a suau moderada (graus determinats segons criteri de l'investigador). Aquests resultats no són contradictoris, ja que se sap que l'increment suau de la retenció d'espermàtides en el testicle pot no veure's reflectit en l'increment en el recompte d'espermàtides resistents a la homogeneïtzació.

Per la seva banda, el recompte d'espermatozoides és un paràmetre per analitzar la producció d'espermatozoides per part del testicle i la capacitat de l'epidídim d'emmagatzemar-los. Se sap que el retardament en el procés d'espermiació pot generar retenció d'espermàtides en el testicle (O'Donnell et al., 2001; OECD, 2008), que, al mateix temps, pot donar a un recompte baix del nombre d'espermatozoides a l'epidídim. En el nostre estudi, s'observa com no hi ha diferències en el nombre d'espermatozoides entre els grups tractats amb n-ButP respecte al grup control-oli. No obstant això, s'observa la disminució en el recompte d'espermatozoides en l'epidídim en els grups tractats amb el n-ButP respecte al control sense vehicle. Aquests resultats mostraren un efecte emmascarador de l'oli de cacauet respecte a l'efecte del n-ButP sobre el nombre d'espermatozoides, la qual cosa suggereix una possible disminució en el nombre d'espermatozoides a causa del DE. Alguns estudis van trobar disminució en el nombre d'espermatozoides després d'una exposició a diferents PBs, com el n-ButP i el n-ProP (Kang et al., 2002; Oishi, 2002a, 2002b, 2001). D'altra banda, s'ha demostrat la relació inversa amb una dieta rica en àcids grassos saturats i el nombre d'espermatozoides, mentre que una dieta rica en àcids grassos insaturats sembla que ajudaria a millorar la qualitat espermàtica (Esmaeili et al., 2015; Saez Lancellotti et al., 2013). L'oli de cacauet és ric en àcids grassos insaturats; no obstant això, els resultats solament mostren un efecte emmascarador de la variabilitat intrínseca del grup control-oli i no ens permet fer una hipòtesi d'un possible efecte positiu per part de l'oli de cacauet. A més,

no s'han trobat estudis que avaluïn l'efecte de l'oli de cacauet amb els paràmetres espermàtics en rates mascle.

La mobilitat, la viabilitat i la morfologia espermàtiques també van ser avaluades després de l'exposició del n-ButP durant un cicle sencer d'espermatogènesi. Aquests paràmetres ens poden reflectir possibles alteracions en el procés d'espermatogènesi o en la maduració dels espermatozoides. En el present treball, l'estudi de la mobilitat presenta tres classificacions: *espermatozoides mòbils progressius*, és a dir, espermatozoides que avancen en una direcció; *espermatozoides mòbils no progressius*, és a dir, espermatozoides que es mouen sobre si mateixos, sense avançar en cap direcció, i finalment, *espermatozoides immòbils*, és a dir, que no presenten cap moviment. Els resultats no mostren la mobilitat espermàtica alterada a causa del n-ButP. Tot i això, es veu la disminució significativa de la mobilitat i l'increment dels espermatozoides immòbils en els grups tractats amb n-ButP respecte al grup control, la qual cosa suggereix una interacció emmascaradora de l'oli de cacauet. Alguns estudis mostren la disminució de la mobilitat espermàtica en rates tractades amb n-ButP a través d'exposició materna (Guerra et al., 2017; Kang et al., 2002). Altres autors no van trobar efectes en la mobilitat en rates púbers exposades al n-ButP a través de la dieta (Hoberman et al., 2008). Respecte a la viabilitat, no es van trobar efectes significatius a causa del n-ButP. Finalment, la morfologia espermàtica sí que va mostrar un increment significatiu de les anormalitats en les dosis de 300 i 600 mg/kg/d respecte del grup control-oli a causa del n-ButP, en què la morfologia del cap és la zona de l'espermatozoide amb un percentatge d'anormalitats més gran. En els nostres resultats s'observa també l'increment de les anormalitats a causa de l'oli de cacauet. Resultats similars recolzen sobre els trobats en aquest estudi (Guerra et al., 2017).

Finalment, la maduresa dels espermatozoides va ser l'últim paràmetre espermàtic analitzat. Aquest paràmetre analitza la condensació de la cromatina, la qual és un indicador de la capacitat i el potencial fertilitzador dels espermatozoides (Hekmatdoost et al., 2009). Aquesta anàlisi no va mostrar alteracions significatives en la condensació de la cromatina en cap dels grups. En el nostre estudi es veu com el paràmetre de la morfologia espermàtica és el més afectat a causa del n-ButP i ens mostra un efecte endocrí en el sistema reproductor dels mascles.

També es va realitzar l'avaluació histopatològica dels òrgans sexuals (testicles, epidídim) i òrgans sexuals accessoris (pròstata i vesícula seminal), així com del fetge. Pel que respecte a l'epidídim, a la

pròstata i al fetge, no es van trobar alteracions histopatològiques en cap dels grups. No obstant això, la pròstata mostra l'increment del pes relatiu en el grup control-oli respecte al grup control. Aquest increment es manté en els grups tractats amb n-ButP, exceptuant la dosi de 300 mg/kg/d. Yamasaki et al. (2001) van estudiar l'efecte de diferents vehicles oliosos sobre el pes prostàtic, entre altres òrgans sexuals, des del DPN 21 i durant 7 o 10 dies en mascles immadurs de rata. Aquests autors van observar l'increment del pes de la pròstata després de ser exposats a l'oli de cacauet, tot i que no van afirmar que aquest increment fos degut a l'oli de cacauet, ja que el grup tractat durant 10 dies no va mostrar aquest increment. A més, no hi ha altres estudis que relacionin el pes prostàtic amb l'oli de cacauet. Se sap que els òrgans sexuals poden incrementar el pes per l'acció dels andrògens, però també per un efecte estrogènic (García-Flórez et al., 2005). En aquest cas, el n-ButP generaria l'increment moderat del pes i pes relatiu prostàtic en la dosi alta. No obstant això, Boberg et al. (2010) observen la reducció en el pes de la pròstata i la vesícula seminal de rates mascle tractades amb n-ButP. Aquests autors suggereixen que la reducció del pes en ambdues glàndules accessòries seria donat per l'alteració dels nivells hormonals.

Respecte al testicle i a la vesícula seminal, es van veure una sèrie d'alteracions histopatològiques amb un grau lleu o moderat de severitat. En els testicles es va veure l'atrofia lleugera de les cèl·lules de Leydig a la dosi de 300 mg/kg/d. Una atrofia a les cèl·lules de Leydig podria suposar una alliberació menor de testosterona i consegüentment l'afectació del procés d'espermatogènesi. En testicle s'ha trobat retenció d'espermàtides en els grups tractats amb el n-ButP i també s'entreveu una possible afectació en el nombre d'espermatozoides a causa del n-ButP, tal com s'ha comentat anteriorment. No obstant això, les cèl·lules de Leydig amb una lleu atrofia solament es troben al grup de 300 mg/kg/d, de tal manera que no és possible realitzar cap associació entre una alteració en el procés d'espermatogènesi i l'atrofia de les cèl·lules de Leydig. Contràriament, Guerra et al. (2017) van observar l'increment del nombre de cèl·lules de Leydig en mascles de rata tractats amb n-ButP a través d'exposició materna. També en la vesícula seminal, s'observa atrofia glandular i disminució del contingut secretor en les dosis tractades amb n-ButP. En els DEs estrogènics, com el n-ButP, l'efecte més habitual que es doni en els òrgans sexuals secundaris és que el pes de l'òrgan disminueixi i/o hi hagi una reducció de la mida glandular i del contingut secretor (OECD, 2008).

Els estudis realitzats en el sistema reproductor ens mostren un cert potencial estrogènic per part del n-ButP, malgrat que aquest arribi en concentracions molt menors de les subministrades subcutàniament, tal com mostra el model PBPK. A més, es sap que el PHBA també presenta un cert

potencial estrogènic (Darbre i Harvey, 2008; Fransway et al., 2019b; Pugazhendhi et al., 2005), fet que recolza la hipòtesi que el n-ButP i els seus catabòlits realitzen un efecte estrogènic en el sistema reproductor dels mascles tractats amb el n-ButP. Una de les explicacions més generalitzades per explicar el potencial estrogènic dels PBs en general és que els PBs poden inhibir l'acció de les SULTs, en què el n-ButP és qui presenta més capacitat per inhibir-les (Prusakiewicz et al., 2007). Aquesta inhibició generaria increment d'estrògens i, per tant, un mecanisme indirecte de l'efecte estrogènic dels PBs. Un altre mecanisme proposat és que els PBs poden inhibir la 17 β -HSD tipus 2, encarregada de la conversió del 17 β -estradiol a estrona (Engeli et al., 2017). Així doncs, una possible inhibició d'aquest enzim suposaria una concentració més gran de 17 β -estradiol i, consegüentment, un efecte estrogènic més gran. A més, cal mencionar que el n-ButP usat en aquests treballs ha estat prèviament dissolt en etanol abans de ser dissolt en el vehicle a causa de la seva baixa solubilitat. En alguns estudis *in vitro* s'ha vist que els alcohols podrien inhibir l'acció de les esterases que hidrolitzarien els PBs, fet que generaria més estabilitat dels PBs en l'organisme (Lakeram et al., 2006) i, consegüentment, més efectes estrogènics. Finalment, alguns estudis han evidenciat que per via subcutània els PBs poden presentar més potencial estrogènic que per via oral (Prusakiewicz et al., 2007; Routledge et al., 1998). Tant els mecanismes d'inhibició de les SULTs i de la 17 β -HSD tipus 2 per part del n-ButP com la millor estabilitat del n-ButP gràcies a la inhibició de les esterases per part de l'alcohol, fan que el n-ButP subministrat en les condicions determinades d'aquesta tesi doctoral presenti un efecte estrogènic en determinats paràmetres analitzats del sistema reproductor de les rates mascle.

D'altra banda, és conegut que diversos metalls, o elements traça, presenten rols importants en l'homeòstasi cel·lular. Alguns autors han relacionat alteracions entre el sistema reproductor i la concentració dels elements traça (Yuksel et al., 2012). En el nostre estudi, es va analitzar la concentració de 10 elements traça en els testicle de rata: Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Se i Zn. No es van detectar nivells de Cd, Co i Pb. El Cd presenta una gran toxicitat en diferents sistemes biològics com els testicles i afecta la mobilitat espermàtica així com el sistema de defensa antioxidant (Adaramoye i Akanni, 2016; Adedara et al., 2015). D'altra banda, el Co és tòxic i carcinogènic (Behl et al., 2015) i el Pb afecta la qualitat espermàtica i l'estereidogènesi i, a més, indueix estrès oxidatiu (EO) (Adedara et al., 2015). Al contrari, es van detectar nivells de Cu, Fe, Mg, Mn, Se i Zn malgrat que no presenten diferències significatives entre els diferents grups. El Mn presenta un paper essencial en la salut reproductiva dels mascles i s'ha vist com un excés en pot

afectar la mobilitat espermàtica i augmentar la peroxidació lipídica (Wan et al., 2019). El Zn està present en grans quantitats en el testicle i té un paper molt important en la divisió dels espermatogonis. Una deficiència de Zn en el testicle es relaciona amb anormalitats espermàtiques com a conseqüència d'una espermatogènesi alterada (Fallah et al., 2018). A més, el Zn pot reduir danys del testicle causats per estrès, per exemple a metalls pesants o a la calor (Fallah et al., 2018). A més a més, el Zn, el Se, el Cu i el Mn són components de proteïnes del sistema antioxidant (Fallah et al., 2018). El Fe pot convertir-se en una font d'ERO mitjançant les reaccions de Fenton i danyar proteïnes, lípids i ADN (Dobrakowski et al., 2018). Finalment, el Mg és important en la maduració de les espermàtides i en la mobilitat espermàtica. També pot actuar com un antagonista intracel·lular del Ca (Abou-Shakra et al., 1989; Wong et al., 2001).

Finalment, el Ca és un element essencial per a la mobilitat espermàtica (Adaramoye i Akanni, 2016) i és l'únic que va mostrar un increment significatiu respecte del grup control, excepte en la dosi de 300 mg/kg/d, a causa de l'oli de cacauet. Yang et al. (2018) van tractar cèl·lules de tropoblast amb PBs i van veure com les ERO induïen a incrementar la concentració de Ca citoplasmàtic. Veiem com l'augment de les ERO implica la despolarització de la membrana mitocondrial i l'increment en la concentració de Ca, els quals poden estar relacionats amb l'exposició als PBs. Per la seva banda, Popa et al. (2014) van suggerir la disrupció del Ca citosòlic al fetge i al ronyó a causa del MetP, ja que van relacionar els efectes del MetP sobre el mitocondri, la qual cosa generaria la despolarització de la membrana mitocondrial i l'esgotament de l'ATP que desencadenarien a un desajustament de la fosforilació oxidativa i en una disrupció de la homeòstasi del Ca citosòlic. Com es veurà posteriorment, en el nostre treball s'observa una relació entre l'increment dels nivells de Ca i un estat d'EO en el testicle, malgrat que aquesta no és a causa de l'exposició al n-ButP.

Se sap que els disruptors endocrins poden generar estrès oxidatiu i, consegüentment, l'increment de les ERO en diversos processos biològics com el sistema reproductor (Sedha et al., 2015). A més, els testicles són molt sensibles a l'EO a causa del seu gran nombre d'àcids grassos poliinsaturats de membrana i les ERO poden generar efectes negatius en els espermatozoides, ja que poden afectar la fluïdesa de la membrana, la qual és determinant per a la mobilitat espermàtica i la capacitat de fecundar l'oòcit (Adaramoye i Akanni, 2016; Kheradmand et al., 2009). Un gran nombre d'estudis relacionen l'exposició de PBs amb l'augment de les ERO (Ateş et al., 2018; Samarasinghe et al., 2018; Silva et al., 2018; Verma i Asnani, 2007). Amb la finalitat de relacionar les anormalitats

reproductives degudes a l'exposició del n-ButP amb un possible increment de l'EO, en el treball 2 es van avaluar diferents ERO així com enzims relacionats amb la defensa antioxidant dels testicles.

Es van determinar les concentracions de H_2O_2 i d'espècies reactives a l'àcid tiobarbitúric (*Thiobarbituric Acid Reactive Species*, TBARS), aquest últim com a indicador de la peroxidació lipídica. En el nostre estudi observem un increment de H_2O_2 i dels TBARS en tots els grups tractats amb l'oli de cacauet excepte en el grup de 600 mg/kg/d, fet que suggereix l'increment de l'EO a causa de l'oli de cacauet, però no es veu afectació per part del n-ButP. Per la seva banda, Riad et al. (2018) van trobar EO en testicles de rata de 21 dies d'edat tractades amb n-ButP durant 8 setmanes a dosis inferiors a 150 mg/kg/d. Aquests autors no van realitzar cap grup control sense vehicle de manera que no es pot saber si aquest generaria EO en els testicles. D'altra banda, l'administració va ser via oral, via que evita les deposicions d'oli subcutànies i, consegüentment, la possible oxidació d'aquest.

L'oli de cacauet és un vehicle molt usat per subministrar substàncies lipofíliques com els PBs. La seva composició molecular és: 35-58% àcid oleic (18:1, n-9) i entre el 20-43% àcid linoleic (18:2, n-6,9). Com a àcid gras saturat principal trobem l'àcid palmític (16:0). En menys proporció es troben l'àcid esteàric (18:0), l'àcid araquídric (20:0), l'àcid behènic (22:0), l'àcid lignocèric (24:0), l'àcid gadoleic (20:1, n-11) i l'àcid araquidònic (20:4, n-5,8,11,14). També es troben traces d'àcid linolènic (18:3, n-6,9,12) (Carrín i Carelli, 2010). També és ric en Vit E. No obstant això, el percentatge de la seva composició pot variar segons l'origen del cacauet. Els àcids grassos insaturats, especialment els poliinsaturats, poden ser ràpidament oxidats i estan relacionats amb la formació de radicals hidroxils i H_2O_2 , així com en la formació de TBARS (Neier et al., 2015; Samarasinghe et al., 2018; Yun i Surh, 2012). Per la seva banda, Levoe et al. (2014) van trobar deposicions d'oli de cacauet sota la pell (de forma similar que en el nostre estudi) després de tractar subcutàniament rates durant 21 dies. Aquests autors van suggerir que l'oli de cacauet podria generar l'activació del sistema immunològic, la qual estaria relacionada amb l'increment de l'EO (Marri i Richner, 2015). Aquests estudis, i sabent que el tractament subcutani és rarament dolorós en rates (Nebendahl, 2000) i genera poc estrès, ens suggereixen que l'augment de H_2O_2 i de TBARS seria a causa de l'oli de cacauet. Aquests resultats indicarien que l'augment dels nivells de Ca en el testicle podrien ser deguts a l'EO generat pel vehicle (oli de cacauet).

No obstant això, la dosi de 600 mg/kg/d mostra un comportament independent a la resta de grups tractats amb l'oli de cacauet. En aquest grup no s'observa l'augment de la concentració de peròxids (d'hidrogen i lipídics), fet que suggereix un possible efecte antioxidant del n-ButP amb tendència a restaurar els nivells de H₂O₂ i de TBARS en el testicle. En el 2013 Kopalli et al. van descriure que el MetP podria inhibir la peroxidació lipídica en cèl·lules neuronals de ratolí. Complementàriament al n-ButP, se sap que els PBs són ràpidament metabolitzats a PHBA i PHHA, principalment (Moos et al., 2016). Aquests dos catabòlits són àcids fenòlics que presenten un cert caràcter antioxidant amb la propietat d'estabilitzar alguns olis (Gómez-Alonso et al., 2002; Nishizawa et al., 2006). A més, s'ha descrit la capacitat del PHBA d'inhibir la peroxidació lipídica (Freinbichler et al., 2008; Soni et al., 2005). Popa et al. (2014) van tractar rates per via oral amb BPA i MetP i van observar que el PHBA tenia la capacitat d'inhibir la peroxidació lipídica, ja que era capaç d'arrestar els radicals hidroxils. Aquests estudis reforcen el possible efecte antioxidant del n-ButP i els catabòlits en els testicles de rata tractats a la dosi de 600 mg/kg/d. Contràriament als nostres resultats, Shah i Verma (2011) suggereixen que el n-ButP pot generar l'augment de la peroxidació lipídica en hepatòcits de ratolí, ja que pot interaccionar fàcilment amb la membrana cel·lular i generar ERO o pot inhibir els enzims antioxidants.

A banda dels estudis que donen suport a la hipòtesi que el n-ButP a dosis elevades pot ser antioxidant, vam realitzar la tècnica del *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), que ens permet mesurar la capacitat antioxidant total d'una mostra, en tres matrius diferents: la part hidrofílica del vehicle (o oli de cacauet) i el vehicle + el n-ButP, l'orina i el sèrum. La primera matriu que vam analitzar des del punt de vista qualitatiu va ser la part hidrofílica de les 3 dosis diferents de n-ButP dissolts en el vehicle i el vehicle sol. El n-ButP es dissol prèviament en etanol, abans de dissoldre's en l'oli de cacauet. Quan es fa l'extracció, en la part hidrofílica obtindríem tots els components dissolts en etanol, és a dir, el n-ButP i altres compostos presents en l'oli de cacauet. Els resultats van detectar capacitat antioxidant en les 3 dosis de n-ButP però no en el vehicle, dades que reforcen una certa capacitat antioxidant del n-ButP. Cal destacar que en aquesta matriu tots els components lipofílics són extrets; per tant, si l'oli de cacauet contingués Vit E, en ser aquesta una substància lipofílica, seria eliminada de la matriu mitjançant el procés d'extracció i no es detectaria la seva capacitat antioxidant en l'ORAC. No obstant això, els resultats del treball no suggereixen que l'oli de cacauet actuï de manera antioxidant en el testicle. A més, s'observen efectes adversos en el sistema reproductor per part de l'oli de cacauet, que podrien o no estar

relacionats amb l'EO. D'altra banda, es van analitzar l'orina i el sèrum de tots els grups. Les mostres d'orina van ser agafades a la meitat del tractament, després del tractament. L'ORAC mostra com els grups amb elevats nivells de H_2O_2 i TBARS presenten una capacitat antioxidant total significativament més petita que el grup control i la dosi de 600 mg/kg/d, en què la capacitat antioxidant total dels dos últims grups és equivalent. Aquests resultats ens indiquen, de forma indirecta, més capacitat antioxidant en la dosi de 600 mg/kg/d respecte a la resta de grups tractats. Aquesta pot estar donada pels nivells elevats de n-ButP, PHBA i PHHA en les mostres d'orina analitzades, fet que reforça la possible capacitat antioxidant que poden generar el n-ButP i/o els seus catabòlits a dosis elevades. Com s'ha comentat amb anterioritat, alguns autors han trobat efectes antioxidants per part dels PBs (Kopalli et al., 2013) i, addicionalment, se sap que els àcids fenòlics tenen capacitat antioxidant (Nishizawa et al., 2006). Respecte del sèrum, va ser obtingut 3 dies després de l'últim tractament i no va mostrar diferències significatives, ja que, com s'ha comentat amb anterioritat, el n-ButP és eliminat del plasma després de 48 hores, tal com mostra el model PBPK dissenyat per l'Aubert et al. (2012).

En les mostres de sèrum dels diferents grups de rates mascle també es va analitzar l'activitat de l'enzim PON1, el qual és sintetitzat al fetge i transportat en el sèrum per les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL). La seva activitat es pot relacionar amb processos oxidatius alterats i com a marcador de la funció hepàtica. A més, la PON1 és una esterasa que pot estar involucrada amb la hidròlisi dels PBs en el plasma (Li et al., 2005; Lindegardh et al., 2006). Després del tractament, s'ha vist la disminució de l'activitat PON1 en la dosi de 600 mg/kg/d respecte del grup control sense vehicle, que pot suggerir un estat previ d'EO i es pot relacionar també amb més estabilitat per part del n-ButP i, consegüentment, amb el possible efecte antioxidant en la dosi alta. Tanmateix, Kulka (2016) exposa en una revisió recent que no hi ha cap estudi previ que relacioni l'activitat PON1 amb el n-ButP.

Amb la finalitat d'analitzar l'estat del sistema antioxidant enzimàtic i no enzimàtic en el testicle, es van avaluar l'activitat de la SOD, la CAT i la GPx, així com la GR i les concentracions de GSH i GSSG. La SOD no mostra diferències significatives en la seva activitat entre cap dels grups analitzats. Sugerim que després de 3 dies des de l'última dosi, l'activitat SOD ja ha estat restaurada. Cal recordar que la SOD actua sobre el RLL superòxid, el qual és un dels RLL inicials i presenta una vida mitjana molt curta (Cano-Europa et al., 2015). Aquest radical és ràpidament convertit en peròxids,

dels quals sí que en trobem nivells elevats en els grups tractats amb oli de cacauet, exceptuant la dosi de 600 mg/kg/d.

Al contrari, la CAT i la GPx van presentar alteracions en la seva activitat. La CAT actua sobre el peròxid d'hidrogen i la GPx sobre qualsevol tipus de peròxid. Els peròxids, com ja s'ha comentat, estan elevats en els grups que presenten EO (control-oli, 150 i 300 mg/kg/d) i l'augment dels quals pot alterar l'activitat CAT i GPx; de fet, la GPx és majoritària en el testicle respecte a la CAT (Bauché et al., 1994). En el nostre estudi s'observa l'increment significatiu de l'activitat GPx en el grup control-oli respecte a tots els altres grups, resultats que suggereixen la reactivació de la GPx com a conseqüència de l'EO. Com s'ha comentat amb anterioritat, els testicles són altament susceptibles a la peroxidació lipídica a causa del seu elevat contingut en lípids poliinsaturats (Bauché et al., 1994). Si avaluem l'expressió proteica de la GPx, la GPx-4 és la principal isoforma en els testicles i actua sobre els lípids de membrana peroxidats (Liang et al., 2009). L'expressió proteica de la GPx-4 no va mostrar diferències entre els grups tractats amb n-ButP respecte del control-oli. Tampoc va mostrar efectes deguts a l'oli de cacauet. Sembla que solament hi ha potenciació de l'activitat del grup control-oli a causa de l'EO, la qual no és suficient per alterar els nivells de l'expressió proteica de la GPx-4.

Respecte a la CAT, només en la dosi de 600 mg/kg/d s'observa la reducció significativa de l'activitat respecte del grup control-oli. Aquesta dosi no presenta elevats nivells de peròxids, fet que suggereix que la seva activitat podria estar alterada per un possible EO previ a causa de l'oli de cacauet. D'altra banda, l'expressió proteica de la CAT va mostrar la disminució significativa en la dosi de 600 mg/kg/d respecte del grup control, la qual cosa suggereix un possible efecte del n-ButP que afectaria altres vies metabòliques. Els mitocondris són molt importants pel metabolisme dels testicles, i Tavares et al. (2009) suggereixen la relació dels PBs amb una possible funció mitocondrial alterada que a la vegada pot afectar la funció espermàtica, així com la regulació i síntesi de proteïnes, tal com els nostres resultats suggereixen. A més, anteriorment s'ha comentat que concentracions elevades de Ca poden ser a causa de la funció mitocondrial alterada, i alguns autors l'han relacionat amb l'exposició a PBs (Popa et al., 2014; Yang et al., 2018). Els nostres resultats suggereixen que l'oli de cacauet provoca EO en el testicle i juntament amb el n-ButP, afecten la funció mitocondrial i generen l'augment de la concentració del Ca. Aquesta alteració en la funció mitocondrial podria estar relacionada amb la disminució de l'expressió proteica, tal com mostren els nostres resultats en les dosis altes del tractament. El fet que aquesta disminució també

es doni en la dosi més alta de n-ButP suggereix un possible EO previ en aquest grup, el qual ha estat restaurat per l'acció antioxidant del n-ButP i els seus catabòlits. Popa et al. (2014) van tractar rates amb BPA i MetP i van suggerir efectes del MetP sobre el mitocondri amb una disrupció de la homeòstasi del Ca i l'efecte antioxidant del catabòlit PHBA.

Finalment, l'activitat GR disminueix significativament en tots els grups tractats amb l'oli de cacauet, incloent la dosi de 600 mg/kg/d, respecte del grup control. No obstant això, el grup tractat amb la dosi alta de n-ButP mostra un lleuger increment significatiu de l'activitat GR respecte a la resta de grups tractats amb el vehicle. Aquests resultats poden estar relacionats amb el possible EO previ degut a l'oli de cacauet, tal com s'ha suggerit prèviament, el qual és restaurat més ràpidament en la dosi de 600 mg/kg/d a causa del possible efecte antioxidant del n-ButP. Alguns autors han observat la disminució de l'activitat dels enzims antioxidants, la depleció del GSH i l'increment dels TBARS a causa de l'exposició oral al n-ButP en fetge de ratolins (Shah i Verma, 2011); no obstant això, i malgrat que els nostres resultats són similars, en el nostre treball sembla que l'efecte és degut a l'oli de cacauet. L'expressió proteica de la GR va ser alterada en les dues dosis més altes (300 i 600 mg/kg/d) de n-ButP respecte del grup control i el control-oli. Les ERO generades a causa de l'oli de cacauet poden afectar l'activitat enzimàtica però no són suficients per alterar l'expressió proteica, la qual pot estar afectada a causa dels PBs mitjançant una possible disrupció de la funció mitocondrial, tal com s'ha exposat amb anterioritat.

Per acabar, la depleció en les concentracions de GSH pot indicar EO. En el nostre treball, trobem la depleció del GSH en els grups control-oli i 300 mg/kg/d respecte del grup control. Contràriament, en la dosi de 600 mg/kg/d es veu un increment significatiu de la concentració de GSH respecte del grup control-oli, que mostra la tendència a restaurar els valors normals de GSH a causa del possible efecte antioxidant del n-ButP. Aquests resultats presenten una certa relació amb l'activitat GR anteriorment descrita. Contràriament, Nakagawa i Moldéus (1998) van descriure la depleció de la GSH en hepatòcits aïllats de rata a causa de l'exposició al n-ButP. Aquests autors suggereixen que la supressió de la GR pot estar relacionada amb la depleció del GSH i que la disminució de les activitats enzimàtiques poden ser degudes a l'oxidació de proteïnes generada pel n-ButP.

Els resultats d'aquest treball 2 mostren que l'EO és generat principalment per l'acció de l'oli de cacauet, ric en àcids grassos insaturats, que afecta els nivells de ERO i l'activitat antioxidant de diversos enzims. Per la seva banda, l'expressió proteica dels enzims antioxidants alterada respon a

l'acció del n-ButP, que actua per una via alternativa, per exemple una possible alteració de la funció mitocondrial (Tavares et al., 2009). Anteriorment, en el nostre estudi s'ha vist com el Ca s'incrementa en els testicles en els grups tractats amb oli. L'increment de Ca també pot estar relacionat amb un problema mitocondrial i d'obtenció d'energia induït per l'oli de cacauet i pel n-ButP.

En aquesta tesi doctoral s'ha analitzat l'efecte del n-ButP en mascles de rata joves a través d'una exposició subcutània durant un cicle sencer d'espermatogènesi. Els resultats mostren alteracions des del punt de vista espermàtic, sobretot morfològic i histopatològic a causa de l'exposició al n-ButP. Alternativament, observem com l'exposició al n-ButP no és causant per si sola d'EO. No obstant això, aquest es dona per l'efecte del vehicle (oli de cacauet), el qual és ric en àcids grassos insaturats que poden oxidar-se de forma ràpida. El vehicle també genera efectes adversos en alguns paràmetres reproductius. Finalment, veiem com a la dosi de 600 mg/kg/d de n-ButP, el n-ButP i els seus catabòlits generen efecte antioxidant en el testicle. El catabòlit PHBA és també un compost amb efecte estrogènic, fet que ens coincideix amb els efectes estrogènics lleus observats en el testicle. El Ca també ens verifica aquestes hipòtesis, ja que és essencial en certs paràmetres espermàtics i el seu increment pot ser a causa de l'EO. Els nostres resultats mostren com els grups amb els nivells de Ca alterats també presenten paràmetres reproductius afectats tant pel n-ButP com pel vehicle. Aquests grups presenten estrès oxidatiu o, alternativament, s'intueix un estrès oxidatiu ja restaurat respecte a la dosi de 600 mg/kg/d.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru

CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

A partir dels resultats experimentals obtinguts en aquesta tesi doctoral, es pot concloure que:

1. L'exposició subcutània al n-ButP no altera ni el pes corporal ni els paràmetres bioquímics analitzats. Tanmateix, el vehicle redueix la concentració de TAG. El n-ButP tampoc afecta la concentració de testosterona ni l'activitat de l'enzim PON1 en sèrum.
2. El pes i el pes relatiu de la pròstata augmenten a causa del n-ButP en la dosi alta, malgrat que el vehicle també en provoca l'augment. Per la seva banda, el pes del fetge i el seu pes relatiu estan reduïts com a conseqüència de l'exposició al vehicle.
3. Amb relació als paràmetres espermàtics associats a la infertilitat:
 - I. La morfologia espermàtica presenta augment de formes anormals de manera dosi-dependent a causa del n-ButP, en què el màxim percentatge d'anormalitats es dona en la morfologia del cap dels espermatozoides. El vehicle també provoca augment de formes anormals.
 - II. El n-ButP redueix el nombre d'espermatozoides i la mobilitat espermàtica. No obstant això, l'efecte del n-ButP està emmascarat per l'efecte del vehicle.
 - III. Respecte del recompte d'espermàtides resistents a la homogeneïtzació, així com dels paràmetres de viabilitat i maduresa, no es veuen afectats ni pel n-ButP ni pel vehicle.
4. Els testicles mostren retenció lleu d'espermàtides a causa del n-ButP, així com atrofia lleu en les cèl·lules de Leydig a la dosi mitjana del n-ButP, mentre que la vesícula seminal presenta atròfia glandular i disminució de la secreció de manera dosi-dependent al n-ButP.
5. El model PBPK mostra una C_{max} dosi-dependent en testicle i en plasma, i aquesta última és el 10% de la quantitat total subministrada. A més, la C_{max} del testicle és superior a la C_{max} del plasma a causa del volum, flux sanguini i, sobretot, coeficient de partició del testicle.
6. El model PBPK mostra com el n-ButP és completament eliminat al cap de 48 hores, tant en testicle com en plasma.
7. Els testicles presenten increment dels nivells de peròxids (d'hidrogen i lipídics), els quals s'associen amb l'estrès oxidatiu, a causa del vehicle. D'altra banda, el grup tractat amb la dosi alta de n-ButP no presenta increment dels nivells de peròxids.
8. El n-ButP i els seus catabòlits presenten capacitat antioxidant total. En la dosi alta, el n-ButP i els seus catabòlits generen efecte antioxidant en els testicles.

9. L'estrès oxidatiu generat pel vehicle provoca depleció en la concentració del GSH. Tanmateix, en la dosi alta s'observa l'increment dels nivells de GSH a causa de l'efecte antioxidant del n-ButP i els seus catabòlits.
10. Amb relació a l'activitat dels enzims del sistema antioxidant:
 - I. La dosi alta de n-ButP redueix l'activitat de la CAT, mentre que la SOD no presenta cap alteració ni per l'efecte del vehicle ni del n-ButP.
 - II. L'estrès oxidatiu generat pel vehicle incrementa l'activitat GPx i redueix l'activitat GR, mentre que el n-ButP redueix l'activitat GPx en tots els grups tractats i incrementa lleugerament l'activitat GR en la dosi alta a causa del seu efecte antioxidant.
11. L'expressió proteica de la GPx-4 no presenta alteracions a causa de l'estrès oxidatiu, mentre que les dosis altes de n-ButP redueixen l'expressió de la GR i la CAT.
12. El calci és l'únic element dels analitzats que incrementa la seva concentració testicular a causa de l'estrès oxidatiu generat pel vehicle.
13. El vehicle subministrat subcutàniament provoca efectes adversos en els espermatozoides, així com l'increment de l'estrès oxidatiu en els testicles.

La conclusió general del treball presentat és:

El n-ButP és absorbit via subcutània i actua com a disruptor endocrí en els mascles joves de rata, provoca alteracions en l'àmbit espermàtic, especialment en la morfologia, i en la histopatologia dels testicles i la vesícula seminal, alteracions que podrien estar relacionades amb la infertilitat. No obstant això, el n-ButP no provoca estrès oxidatiu als testicles, estrès que és generat per l'exposició al vehicle, fet que ens suggereix que el control específic del vehicle és necessari en estudis in vivo. Addicionalment, el n-ButP i els seus catabòlits generen efecte antioxidant en la dosi alta.

REFERÈNCIES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

- Abbas, S., Greige-Gerges, H., Karam, N., Piet, M.H., Netter, P., Magdalou, J., 2010. Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in man. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25, 568–577.
- Abou-Shakra, F.R., Ward, N.I., Everard, D.M., 1989. The role of trace elements in male infertility. *Fertil. Steril.* 52, 307–310.
- Adaramoye, O.A., Akanni, O.O., 2016. Protective effects of *Artocarpus altilis* (Moraceae) on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Andrologia* 48, 152–163.
- Adedara, I.A., Awogbindin, I.O., Adesina, A.A., Oyebiyi, O.O., Lawal, T.A., Farombi, E.O., 2015. Municipal landfill leachate-induced testicular oxidative damage is associated with biometal accumulation and endocrine disruption in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 74–82.
- Adoamnei, E., Mendiola, J., Moñino-García, M., Vela-Soria, F., Iribarne-Durán, L.M., Fernández, M.F., Olea, N., Jørgensen, N., Swan, S.H., Torres-Cantero, A.M., 2018. Urinary concentrations of parabens and reproductive parameters in young men. *Sci. Total. Environ.* 621, 201–209.
- Agarwal, A., Prabakaran, S.A., 2005. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. *Iran. J. Reprod. Med.* 3, 1–8.
- Aitken, R.J., Roman, S.D., 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1, 15–24.
- Alam, M.S., Ohsako, S., Kanai, Y., Kurohmaru, M., 2014. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepuberal rats. *Acta Histochem.* 116, 474–480.
- Al-Dalaen, S.M., Al-Qtaitat, A.I., 2014. Review article: Oxidative stress versus antioxidants. *Am. J. Biosci. Bioeng.* 2, 60–71.
- Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., Rafieian-Kopaei, M., 2017. The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: A review. *J. Clin. Diagn. Res.* 11, 1E01–1E05.

- Ateş, P.S., Ünal, İ., Üstündağ, Ü.V., Alturfan, A.A., Yiğitbaşı, T., Emekli-Alturfan, E., 2018. Methylparaben induces malformations and alterations on apoptosis, oxidant–antioxidant status, *ccnd1* and *myca* expressions in zebrafish embryos. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32, 1–6.
- Aubert, N., Ameller, T., Legrand, J.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.
- Bais, H.P., Vepachedu, R., Vivanco, J.M., 2003. Root specific elicitation and exudation of fluorescent b-carbolines in transformed root cultures of *Oxalis tuberosa*. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 345–353.
- Baker, M.A., Aitken, R.J., 2004. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 216, 47–54.
- Barouki, R., 2017. Endocrine disruptors: Revisiting concepts and dogma in toxicology. *C. R. – Biol.* 340, 410–413.
- Bauché, F., Fouchard, M.H., Jégou, B., 1994. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.* 349, 392–396.
- Behl, M., Stout, M.D., Herbert, R.A., Dill, J.A., Baker, G.L., Hayden, B.K., Roycroft, J.H., Bucher, J.R., Hooth, M.J., 2015. Comparative toxicity and carcinogenicity of soluble and insoluble cobalt compounds. *Toxicology* 333, 195–205.
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., Donato, R., 2018. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 1865, 721–733.
- Bennetts, L.E., Aitken, R.J., 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 77–87.
- Betteridge, D.J., 2000. What is oxidative stress? *Metabolism* 49, 3–8.
- Błedzka, D., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W., 2014. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ. Int.* 67, 27–42.
- Boberg, J., Axelstad, M., Svngen, T., Mandrup, K., Christiansen, S., Vinggaard, A.M., Hass, U., 2016.

- Multiple endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to butylparaben. *Toxicol. Sci.* 152, 244–256.
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., Hass, U., 2010. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod. Toxicol.* 30, 301–312.
- Braun, L., Cohen, M., 2015. *Herbs & Natural supplement: An evidence-based guide*, fourth ed., vol. 2. Churchill Livingstone, Elsevier, Chatswood, NSW.
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532.
- Brown, S.E., Sant, K.E., Fleischman, S.M., Venezia, O., Roy, M.A., Zhao, L., Timme-Laragy, A.R., 2018. Pancreatic beta cells are a sensitive target of embryonic exposure to butylparaben in zebrafish (*Danio rerio*). *Birth Defects Res.* 110, 933–948.
- Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G., Pope, G.S., Sauer, M.J., Darbre, P.D., 2002. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80, 49–60.
- Cano-Europa, E., Blas-Valdivia, V., Franco-Colin, M., Ortiz-Butron, R., 2015. Regulation of the redox environment, in: Gowder, S.J.T. (Ed.), *Basic principles and clinical significance of oxidative stress*, Chapter 1. InTech Open, pp. 3–15.
- Canosa, P., Pérez-Palacios, D., Garrido-López, A., Tena, M.T., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., 2007. Pressurized liquid extraction with in-cell clean-up followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for the selective determination of parabens and triclosan in indoor dust. *J. Chromatogr. A* 1161, 105–112.
- Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., Bourguiba, S., 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: A review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 35.
- Carrín, M.E., Carelli, A.A., 2010. Peanut oil: Compositional data. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 697–707.
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2007. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care

- products. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 278–284.
- Chen, Q., Pan, C., Li, Y., Zhang, M., Gu, W., 2016a. The combined effect of methyl- and ethylparaben on lifespan and preadult development period of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J. Insect Sci.* 16, 1–8.
- Chen, Y.I., Wei, P.C., Hsu, J.L., Su, F.Y., Lee, W.H., 2016b. NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. *Am. J. Transl. Res.* 8, 1626–1640.
- Combarrous, Y., 2017. Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *C. R. - Biol.* 340, 406–409.
- Comeche, A., Martín-Villamil, M., Picó, Y., Varó, I., 2017. Effect of methylparaben in *Artemia franciscana*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 199, 98–105.
- Comhaire, F.H., Mahmoud, A.M., Schoonjans, F., 2007. Sperm quality, birth rates and the environment in Flanders (Belgium). *Reprod. Toxicol.* 23, 133–137.
- Cosmetic Ingredient Review (CIR), 2008. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *Int. J. Toxicol.* 27, 1–82.
- Creasy, D.M., 1997. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol. Pathol.* 25, 119–131.
- Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2014. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: A review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J. Appl. Toxicol.* 34, 925–938.
- Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2008. Paraben esters: Review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.* 28, 561–578.
- Dobrakowski, M., Kaletka, Z., Machoń-Grecka, A., Kasperczyk, S., Horak, S., Birkner, E., Zalejska-Fiolka, J., Kasperczyk, A., 2018. The role of oxidative stress, selected metals, and parameters of the immune system in male fertility. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1–8.
- DrugBank, 2019. Peanut Oil. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB13964> [accès el 21/06/2019].

- Duty, S.M., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Chen, Z., Herrick, R.F., Christiani, D.C., Hauser, R., 2003. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14, 269–277.
- Engeli, R.T., Rohrer, S.R., Vuorinen, A., Herdlinger, S., Kaserer, T., Leugger, S., Schuster, D., Odermatt, A., 2017. Interference of paraben compounds with estrogen metabolism by inhibition of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2007.
- Esmaeili, V., Shahverdi, A.H., Moghadasian, M.H., Alizadeh, A.R., 2015. Dietary fatty acids affect semen quality: a review. *Andrology* 3, 450–461.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2004. EFSA advises on the safety of paraben usage in food. <https://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/afc040929> [accés el 28/04/2019].
- Fallah, A., Mohammad-Hasani, A., Colagar, A.H., 2018. Zinc is an essential element for male fertility: A review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. *J. Reprod. Infertil.* 19, 69–81.
- Fisher, J.S., Turner, K.J., Brown, D., Sharpe, R.M., 1999. Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environ. Health Persp.* 107, 397–405.
- Food and drug administration (FDA), 2016. Parabens in Cosmetics.
- Fransway, A.F., Fransway, P.J., Belsito, D.V., Warshaw, E.M., Sasseville, D., Fowler, J.F., DeKoven, J.G., Pratt, M.D., Maibach, H.I., Taylor, J.S., Marks, J.G., Mathias, C.G.T., DeLeo, V.A., Zirwas, J.M., Zug, K.A., Atwater, A.R., Silverberg, J., Reeder, M.J., 2019a. Parabens. *Dermatitis* 30, 3–31.
- Fransway, A.F., Fransway, P.J., Belsito, D.V., Yiannias, J.A., 2019b. Paraben Toxicology. *Dermatitis* 30, 32–45.
- Fregoso Aguilar, T.A., Hernández Navarro, B.C., Mendoza Pérez, J.A., 2016. Endogenous antioxidants: A review of their role in oxidative stress, in: Morales-Gonzalez, J.A., Morales-Gonzalez, A., Madrigal-Santillan, E.O. (Eds.), Master regulator of oxidative stress—The transcription factor Nrf2, Chapter 1. InTech Open, pp. 3–19.
- Freinbichler, W., Bianchi, L., Colivicchi, M.A., Ballini, C., Tipton, K.F., Linert, W., Corte, L.D., 2008.

- The detection of hydroxyl radicals *in vivo*. *J. Inorg. Biochem.* 102, 1329–1333.
- García-Espiñeira, M.C., Tejada-Benítez, L.P., Olivero-Verbel, J., 2018. Toxic effects of bisphenol A, propyl paraben, and triclosan on *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 684.
- García-Flórez, M., Oliveira, C.A., Carvalho, H.F., 2005. Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 487–497.
- Gazin, V., Marsden, E., Marguerite, F., 2013. Oral propylparaben administration to juvenile male Wistar rats did not induce toxicity in reproductive organs. *Toxicol. Sci.* 136, 392–401.
- Ghadimi Nouran, M., Kimiagar, M., Abadi, A., Mirzazadeh, M., Harrison, G., 2010. Peanut consumption and cardiovascular risk. *Public Health Nutr.* 13, 1581–1586.
- 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. *Environ. Res.* 151, 251–264.
- Glander, H.G., Rytter, M., Schönborn, C., 1984. Studies on the mycotic and bacterial risk of contamination and the use of nipagin in the artificial insemination of cryosperm. *Zentralbl. Gynakol.* 106, 573–584.
- Gómez-Alonso, S., Salvador, M., Fregapane, G., 2002. Phenolic compound profile of cornicabra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6812–6817.
- Griswold, M.D., 2016. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol. Rev.* 96, 1–17.
- Guerra, M.T., Sanabria, M., Leite, G.A., Borges, C.S., Cuciolo, M.S., Anselmo-Franci, J.A., Foster, W.G., Kempinas, W.G., 2017. Maternal exposure to butyl paraben impairs testicular structure and sperm quality on male rats. *Environ. Toxicol.* 32, 1273–1289.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 2018. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 502, 183–186.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine, in: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free radicals in biology and medicine*, third ed. Oxford University Press, Oxford, pp. 1–25.

- Handa, O., Kokura, S., Adachi, S., Takagi, T., Naito, Y., Tanigawa, T., Yoshida, N., Yoshikawa, T., 2006. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology* 227, 62–72.
- Harvey, P.W., Darbre, P., 2004. Endocrine disrupters and human health: Could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? A review of evidence and call for further research. *J. Appl. Toxicol.* 24, 167–176.
- Hekmatdoost, A., Lakpour, N., Sadeghi, M.R., 2009. Sperm chromatin integrity: etiologies and mechanisms of abnormality, assays, clinical importance, preventing and repairing damage. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 1, 147–160.
- Hess, R.A., 1999. Spermatogenesis, Overview, in: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, New York, pp. 539–545.
- Hess, R.A., Carnes, K., 2004. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim. Reprod.* 1, 5–30.
- Hill, M.A., 2019. Embryology. <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php> [accés el 07/05/2019].
- Hipwell, A.E., Kahn, L.G., Factor-Litvak, P., Porucznik, C.A., Siegel, E.L., Fichorova, R.N., Hamman, R.F., Klein-Fedyshin, M., Harley, K.G., 2019. Exposure to non-persistent chemicals in consumer products and fecundability: A systematic review. *Hum. Reprod. Update* 25, 51–71.
- Hoberman, A.M., Schreur, D.K., Leazer, T., Daston, G.P., Carthew, P., Re, T., Loretz, L., Mann, P., 2008. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 83, 123–133.
- Holst, J.P., Soldin, O.P., Guo, T., Soldin, S.J., 2004. Steroid hormones: Relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clin. Lab. Med.* 24, 105–118.
- Hood, R.D., 2011. *Developmental and Reproductive Toxicology. A practical approach*, third ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hrycay, E.G., Bandiera, S.M., 2015. Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer. *Adv. Pharmacol.* 74, 35–84.

- Janjua, N.R., Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E., Wulf, H.C., Andersson, A.M., 2008. Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *Int. J. Androl.* 31, 118–130.
- Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), 1974. Evaluación Toxicológica de ciertos aditivos alimentarios con un examen de los principios generales y de las normas. [Language: Spanish]
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 241–258.
- Kang, K.S., Che, J.H., Ryu, D.Y., Kim, T.W., Li, G.X., Lee, Y.S., 2002. Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). *J. Vet. Med. Sci.* 64, 227–235.
- Kang, S., Kim, S., Park, J., Kim, H.J., Lee, J., Choi, G., Choi, S., Kim, S.Y., Moon, H.B., Kim, S., Kho, Y.L., Choi, K., 2013. Urinary paraben concentrations among pregnant women and their matching newborn infants of Korea, and the association with oxidative stress biomarkers. *Sci. Total Environ.* 461-462, 214–221.
- Kheradmand, A., Alirezaei, M., Asadian, P., Rafiei Alavi, E., Joorabi, S., 2009. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. *Andrologia* 41, 335–340.
- Kim, M.J., Kwack, S.J., Lim, S.K., Kim, Y.J., Roh, T.H., Choi, S.M., Kim, H.S., Lee, B.M., 2015. Toxicological evaluation of isopropylparaben and isobutylparaben mixture in Sprague-Dawley rats following 28 days of dermal exposure. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73, 544–551.
- Kira, Y., Sato, E.F., Inoue, M., 2002. Association of Cu,Zn-type superoxide dismutase with mitochondria and peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 399, 96–102.
- Kizhedath, A., Wilkinson, S., Glassey, J., 2019. Assessment of hepatotoxicity and dermal toxicity of butyl paraben and methyl paraben using HepG2 and HDFn *in vitro* models. *Toxicol. in Vitro* 55, 108–115.
- Kjaerstad, M.B., Taxvig, C., Andersen, H.R., Nellemann, C., 2010. Mixture effects of endocrine disrupting compounds *in vitro*. *Int. J. Androl.* 33, 425–433.

- Knez, J., 2013. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reprod. Biomed.* Online. 26, 440–448.
- Kopalli, S.R., Noh, S.J., Koppula, S., Suh, Y.H., 2013. Methylparaben protects 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and improved behavioral impairments in mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 34, 25–32.
- Kris-Etherton, P.M., Pearson, T.A., Wan, Y., Hargrove, R.L., Moriarty, K., Fishell, V., Etherton, T.D., 1999. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 1009–1015.
- Kris-Etherton, P.M., Zhao, G., Binkoski, A.E., Coval, S.M., Etherton, T.D., 2001. The effect of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr. Rev.* 59, 103–111.
- Kulka, M., 2016. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. *Pol. J. Vet. Sci.* 19, 225–232.
- Lakeram, M., Paine, A.J., Lockley, D.J., Sanders, D.J., Pendlington, R., Forbes, B., 2006. Transesterification of p-hydroxybenzoate esters (parabens) by human intestinal (Caco-2) cells. *Xenobiotica* 36, 739–749.
- Lemini, C., Jaimez, R., Ávila, M.E., Franco, Y., Larrea, F., Lemus, A.E., 2003. *In vivo* and *in vitro* estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol. Ind. Health* 19, 69–79.
- Levoe, S.N., Flannery, B.M., Brignolo, L., Imai, D.M., Koehne, A., Austin, A.T., Bruun, D.A., Tancredi, D.J., Lein, P.J., 2014. Factors influencing adverse skin responses in rats receiving repeated subcutaneous injections and potential impact on neurobehavior. *Curr. Neurobiol.* 5, 1–10.
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P., Lockridge, O., 2005. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1673–1684.
- Li, T.Y., Brennan, A.M., Wedick, N.M., Mantzoros, C., Rifai, N., Hu, F.B., 2009. Regular consumption of nuts is associated with a lower risk of cardiovascular disease in women with type 2 diabetes. *J. Nutr.* 139, 1333–1338.
- Liang, H., Yoo, S.E., Na, R., Walter, C.A., Richardson, A., Ran, Q., 2009. Short form glutathione

- peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J. Biol. Chem.* 284, 30836–30844.
- Liebert, N.A., 1984. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben. *J. Am. Coll. Toxicol.* 3, 147–209.
- Lindegardh, N., Davies, G.R., Hien, T.T., Farrar, J., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., White, N.J., 2006. Rapid degradation of oseltamivir phosphate in clinical samples by plasma esterases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3197–3199.
- Luetjens, C.M., Weinbauer, G.F., 2012. Functional assessment of sexual maturity in male macaques (*Macaca fascicularis*). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 391–400.
- Maqbool, F., Mostafalou, S., Bahadar, H., Abdollahi, M., 2016. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sci.* 145, 265–273.
- Marri, V., Richner, H., 2015. Immune response, oxidative stress and dietary antioxidants in great tit nestlings. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 179, 192–196.
- Martínez Álvarez, J.R., Valls Bellés, V., Villarino Marín, A., 2007. El lúpulo contenido en la cerveza, su efecto antioxidante en un grupo controlado de población - Estudio 16. Centro de Información Cerveza y Salud, Madrid.
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de Kretser, D.M., Pratis, K., Robertson, D.M., 2002. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 149–179.
- Meeker, J.D., Yang, T., Ye, X., Calafat, A.M., Hauser, R., 2011. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ. Health Perspect.* 119, 252–257.
- Monneret, C., 2017. What is an endocrine disruptor? *C. R. - Biol.* 340, 403–405.
- Moos, R.K., Angerer, J., Dierkes, G., Brüning, T., Koch, H.M., 2016. Metabolism and elimination of methyl, iso- and n-butyl paraben in human urine after single oral dosage. *Arch. Toxicol.* 90, 2699–2709.

- Nakagawa, Y., Moldéus, P., 1998. Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1907–1914.
- National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), 2019. <https://www1.nichd.nih.gov/espanol/salud/temas/infertility/Pages/default.aspx> [accés el 24/05/2019].
- Nebendahl, K., 2000. Routes of administration, in: Krinke, G.J. (Ed.), *The laboratory rat*. Academic Press, San Diego, pp. 463–483.
- Neier, K., Marchlewicz, E.H., Dolinoy, D.C., Padmanabhan, V., 2015. Assessing human health risk to endocrine disrupting chemicals: a focus on prenatal exposures and oxidative stress. *Endocr. Disruptors (Austin)* 3, e1069916.
- Nishihama, Y., Toshima, H., Yoshinaga, J., Mizumoto, Y., Yoneyama, M., Nakajima, D., Shiraishi, H., Tokuoka, S., 2017. Paraben exposure and semen quality of Japanese male partners of subfertile couples. *Environ. Health Prev. Med.* 22, 5.
- Nishizawa, C., Takeshita, K., Ueda, J., Nakanishi, I., Suzuki, K.T., Ozawa, T., 2006. Reaction of para-hydroxybenzoic acid esters with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. *Free Radic. Res.* 40, 233–240.
- Nohynek, G.J., Borgert, C.J., Dietrich, D., Rozman, K.K., 2013. Endocrine disruption: Fact or urban legend? *Toxicol. Lett.* 223, 295–305.
- Nowak, K., Ratajczak-Wrona, W., Górska, M., Jabłońska, E., 2018. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 474, 238–251.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 22, 289–318.
- Oishi, S., 2004. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1845–1849.
- Oishi, S., 2002a. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Arch. Toxicol.* 76, 423–429.

- Oishi, S., 2002b. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1807–1813.
- Oishi, S., 2001. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol. Ind. Health* 17, 31–39.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2008. Endocrine Disruption: a guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests. Guidelines for histopathologic evaluation.
- Peng, X., Adachi, K., Chen, C., Kasai, H., Kanoh, K., Shizuri, Y., Misawa, N., 2006. Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5556–5561.
- Picut, C.A., Ziejewski, M.K., Stanislaus, D., 2018. Comparative aspects of pre- and postnatal development of the male reproductive system. *Birth Defects Res.* 110, 190–227.
- Popa, D.S., Bolfa, P., Kiss, B., Vlase, L., Păltinean, R., Pop, A., Cătoi, C., Crișan, G., Loghin, F., 2014. Influence of *Genista tinctoria* L. or methylparaben on subchronic toxicity of bisphenol A in rats. *Biomed. Env. Sci.* 27, 85–96.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), 2015. Diagnostic evaluation of the infertile male: A committee opinion. *Fertil. Steril.* 103, e18–e25.
- Prusakiewicz, J.J., Harville, H.M., Zhang, Y., Ackermann, C., Voorman, R.L., 2007. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology* 232, 248–256.
- Pugazhendhi, D., Pope, G.S., Darbre, P.D., 2005. Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *J. Appl. Toxicol.* 25, 301–309.
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2, 219–236.
- Ramaswamy, B.R., Kim, J.W., Isobe, T., Chang, K.H., Amano, A., Miller, T.W., Siringan, F.P., Tanabe, S., 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.* 192, 1739–1745.
- Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E., Oliveira, P.F., 2012. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol.* 9, 330–338.
- Riad, M.A., Abd-Rabo, M.M., Abd El Aziz, S.A., El Behairy, A.M., Badawy, M.M., 2018. Reproductive toxic impact of subchronic treatment with combined butylparaben and triclosan in weanling male rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32, e22037.
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P., 1998. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 12–19.
- Russell, L.D., 1993. Role in spermiation, in: Griswold, M.D., Russell, L.D. (Eds.), *The Sertoli cell*. Cache River Press, Clearwater, FL, pp. 269–304.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. *Histological and histopathological evaluation of the testis*, first ed. Cache River Press, Clearwater, FL.
- Saez Lancellotti, T.E., Boarelli, P.V., Romero, A.A., Funes, A.K., Cid-Barria, M., Cabrillana, M.E., Monclus, M.A., Simón, L., Vicenti, A.E., Fornés, M.W., 2013. Semen quality and sperm function loss by hypercholesterolemic diet was recovered by addition of olive oil to diet in rabbit. *PLoS One* 8, e52386.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* 23, 737–752.
- Samarasinghe, S.V.A.C., Krishnan, K., Naidu, R., Megharaj, M., Miller, K., Fraser, B., Aitken, R.J., 2018. Parabens generate reactive oxygen species in human spermatozoa. *Andrology* 6, 532–541.
- Sanocka, D., Kurpisz, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 12.
- Satoh, K., Nonaka, R., Ohyama, K., Nagai, F., 2005. Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 Cells (AR-EcoScreen system). *J. Health Sci.* 51, 557–568.

- Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2013. Opinion on Paraben. Updated Request for a Scientific Opinion on Propyl- and Butylparaben: COLIPA N P82. SCCS/1514/13. EC (European Commission).
- Scinicariello, F., Buser, M.C., 2016. Serum testosterone concentrations and urinary bisphenol A, benzophenone-3, triclosan, and paraben levels in male and female children and adolescents: NHANES 2011–2012. *Environ. Health Perspect.* 124, 1898–1904.
- Sedha, S., Kumar, S., Shukla, S., 2015. Role of oxidative stress in male reproductive dysfunctions with reference to phthalate compounds. *Urol. J.* 12, 2304–2316.
- Segura, R., 2014. Els radicals lliures. Els seus efectes sobre les estructures biomolècules i sobre la salut de l'individu. *TECA Tecnol. i Ciència dels Aliments.* 14, 3–33.
- Shah, K.H., Verma, R.J., 2011. Butyl p-hydroxybenzoic acid induces oxidative stress in mice liver—an *in vivo* study. *Acta Pol. Pharm.* 68, 875–879.
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341, 1392–1395.
- Shiraishi, K., Naito, K., 2007. Nitric oxide produced in the testis is involved in dilatation of the internal spermatic vein that compromises spermatogenesis in infertile men with varicocele. *BJU Int.* 99, 1086–1090.
- Shiraishi, K., Naito, K., Yoshida, K., 2001. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol. Reprod.* 65, 514–521.
- Showell, M.G., Brown, J., Yazdani, A., Stankiewicz, M.T., Hart, R.J., 2011. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007411.
- Sidorkiewicz, I., Zaręba, K., Wołczyński, S., Czerniecki, J., 2017. Endocrine-disrupting chemicals - Mechanisms of action on male reproductive system. *Toxicol. Ind. Health* 33, 601–609.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748.
- Silva, D.C., Serrano, L., Oliveira, T.M.A., Mansano, A.S., Almeida, E.A., Vieira, E.M., 2018. Effects of parabens on antioxidant system and oxidative damages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 85–91.

- Smarr, M.M., Sundaram, R., Honda, M., Kannan, K., Louis, G.M., 2017. Urinary concentrations of parabens and other antimicrobial chemicals and their association with couples' fecundity. *Environ. Health Perspect.* 125, 730–736.
- Song, B.L., Peng, D.R., Li, H.Y., Zhang, G.H., Zhang, J., Li, K.L., Zhao, Y.Q., 1991. Evaluation of the effect of butyl p-hydroxybenzoate on the proteolytic activity and membrane function of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 91, 435–440.
- Soni, M.G., Burdock, G.A., Taylor, S.L., Greenberg, N.A., 2001. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* 39, 513–532.
- Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A., 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* 43, 985–1015.
- Tavares, R.S., Martins, F.C., Oliveira, P.J., Ramalho-Santos, J., Peixoto, F.P., 2009. Parabens in male infertility—Is there a mitochondrial connection? *Reprod. Toxicol.* 27, 1–7.
- Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Hass, U., Axelstad, M., Boberg, J., Hansen, P.R., Frederiksen, H., Nellemann, C., 2008. Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis? *Toxicol. Sci.* 106, 206–213.
- Turner, T.T., Lysiak, J.J., 2008. Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction. *J. Androl.* 29, 488–498.
- van Meeuwen, J.A., van Son, O., Piersma, A.H., de Jong, P.C., van den Berg, M., 2008. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 372–382.
- Verma, R.J., Asnani, V., 2007. Ginger extract ameliorates paraben induced biochemical changes in liver and kidney of mice. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 64, 217–220.
- Vo, T.T.B., Jung, E.M., Choi, K.C., Yu, F.H., Jeung, E.B., 2011. Estrogen receptor α is involved in the induction of Calbindin-D(9k) and progesterone receptor by parabens in GH3 cells: a biomarker gene for screening xenoestrogens. *Steroids* 76, 675–681.
- 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. *Reprod. Toxicol.* 29, 306–316.

- Walczak–Jedrzejowska, R., Wolski, J.K., Slowikowska-Hilczer, J., 2013. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent. European J. Urol.* 66, 60–67.
- Wan, Z.Z., Chen, H.G., Lu, W.Q., Wang, Y.X., Pan, A., 2019. Metal/metalloid levels in urine and seminal plasma in relation to computer-aided sperm analysis motion parameters. *Chemosphere* 214, 791–800.
- Watkins, D.J., Ferguson, K.K., Anzalota Del Toro, L.V., Alshwabkeh, A.N., Cordero, J.F., Meeker, J.D., 2015. Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218, 212–219.
- Wong, W.Y., Flik, G., Groenen, P.M., Swinkels, D.W., Thomas, C.M., Copius-Peereboom, J.H., Merkus, H.M., Steegers-Theunissen, R.P., 2001. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod. Toxicol.* 15, 131–136.
- World Health Organization (WHO), 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, fifth ed. WHO Press, Geneva.
- World Health Organization/International Program on Chemical Safety (WHO/IPCS), 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.
- Yamamoto, H., Tamura, I., Hirata, Y., Kato, J., Kagota, K., Katsuki, S., Yamamoto, A., Kagami, Y., Tatarazako, N., 2011. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. *Sci. Total Environ.* 410–411, 102–111.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Takatuki, M., 2001. Effects of olive, corn, sesame or peanut oil on the body weights and reproductive organ weights of immature male and female rats. *Exp. Anim.* 50, 173–177.
- Yang, C., Lim, W., Bazer, F.W., Song, G., 2018. Butyl paraben promotes apoptosis in human trophoblast cells through increased oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress. *Environ. Toxicol.* 33, 436–445.
- Yoshikawa, T., Naito, Y., 2002. What is oxidative stress ? *J. Japan Med. Assoc.* 45, 271–276.

- Yuksel, M.B., Kavak, S., Gecit, I., Basel, H., Gümrükçüoğlu, H.A., Demir, H., Meral, I., 2012. Short-term levosimendan treatment protects rat testes against oxidative stress. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 45, 716–720.
- Yun, J.M., Surh, J., 2012. Fatty acid composition as a predictor for the oxidation stability of korean vegetable oils with or without induced oxidative stress. *Prev. Nutr. Food Sci.* 17, 158–165.
- Zamkowska, D., Karwacka, A., Jurewicz, J., Radwan, M., 2018. Environmental exposure to non-persistent endocrine disrupting chemicals and semen quality: An overview of the current epidemiological evidence. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 31, 377–414.
- Zhang, L., Dong, L., Ding, S., Qiao, P., Wang, C., Zhang, M., Zhang, L., Du, Q., Li, Y., Tang, N., Chang, B., 2014. Effects of n-butylparaben on steroidogenesis and spermatogenesis through changed E₂ levels in male rat offspring. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 705–717.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

ANNEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

Llistat de publicacions i congressos obtingut durant el període de la tesi doctoral:

Publicacions

Schreiber, E., Garcia, T., Sharma, R.P., Torrente, M., Domingo, J.L., Gómez, M., 2019. Oxidative stress in testes of rats exposed to n-butylparaben. *Food and Chemical Toxicology* 131, 110573. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110573> **Quartil 1. Factor d'impacte: 3.775. SJR: 0.916 [Any: 2018/2019]**

Schreiber, E., Alfageme, O., Garcia, T., González, N., Sirvent, J.J., Torrente, M., Gómez, M., Domingo, J.L., 2019. Oral exposure of rats to dienestrol during gestation and lactation: Effects on the reproductive system of male offspring. *Food and Chemical Toxicology* 128, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.013> **Quartil 1. Factor d'impacte: 3.775. SJR: 0.916 [Any: 2018/2019]**

Garcia, T.¹, **Schreiber, E.**¹, Kumar, V., Prasad, R., Sirvent, J. J., Domingo, J. L., Gómez, M., 2017. Effects on the reproductive system of young male rats of subcutaneous exposure to n-butylparaben. *Food and Chemical Toxicology* 106, 47-57. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.031> **Quartil 1. Factor d'impacte: 3.977. SJR: 1.144 [Any: 2017]**

¹Els dos primers autors van contribuir equitativament en aquest treball

Congressos

SETAC Europe 29th Annual Meeting. **Schreiber, E.**, González, N., Kumar, V., Torrente, M., Domingo, J.L., Gómez, M. Feminization effects on male offspring rats through maternal exposure to flutamide, linuron and dienestrol. Helsinki, Finlàndia, 2019.

54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018). **Schreiber, E.**, Garcia, T., Torrente, M., Kumar, V., Sharma, R.P., Domingo, J.L., Gómez, M. Assessment of the oxidative stress effects on the reproductive system of young male rats to n-butylparaben. Brusel·les, Bèlgica, 2018.

54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018). González, N., **Schreiber, E.**, Alfageme, O., Torrente, M., Domingo, J.L., Gómez, M. Assessment of reproductive toxicity of male rats through maternal exposure to dienestrol. Brusel·les, Bèlgica, 2018.

Participació en altres projectes:

Projecte EuroMix (European Test and Risk Assessment Strategies for Mixtures), 15/05/2015-14/05/2019. Projecte europeu emmarcat dins el Programa Marc Horitzó 2020 (Horizon 2020 Framework Programme) finançat per la Unió Europea dins l'acord de subvenció No. 633172.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES

Elga Schreiber Bru

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFFECTES DE L'EXPOSICIÓ AL N-BUTILPARABÈN EN EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULÍ I L'ESTRÈS
OXIDATIU EN TESTICLES DE RATES JOVES
Elga Schreiber Bru



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI