



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

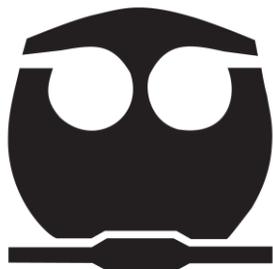
TESIS

“Efecto de la administración perinatal del disruptor endócrino Bisfenol-A sobre la expresión de las proteínas Claudina 3, 4 y 7 en el útero de ratas durante la gestación temprana.”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JORGE RIVERA BAÑOS



Ciudad Universitaria, Ciudad de México 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:.....Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Vocal:.....Dra. María Elena Ibarra Rubio

Secretario:.....Dr. Euclides Ávila Chávez

1er. Suplente:.....Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2do. Suplente:.....Dr. Félix Morales Flores

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Laboratorio 206 del Edificio F1 de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesora:

Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Sustentante:

Jorge Rivera Baños

Índice

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3. Antecedentes.	3
3.1. Disruptores endócrinos.	3
3.2. Generalidades del Bisfenol A.	4
3.3. Efectos adversos del Bisfenol A.	5
3.4. Impacto del Bisfenol A en la fertilidad humana.	9
3.4.1. Efecto del BPA en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.	10
3.4.2. Efecto del BPA en el útero.	12
3.4.3. Efecto del BPA en la gestación.	14
3.4.4. Efecto del BPA en la implantación del blastocisto.	14
3.5. Proteínas de Uniones Estrechas (TJ).	19
3.6. Claudinas.	22
3.6.1. Claudina-3.	24
3.6.2. Claudina-4.	25
3.6.3. Claudina-7.	25
3.6.4. Expresión de claudinas en el epitelio uterino.	26
3.7. Enfermedades relacionadas con las claudinas.	28
3.8. Efecto del BPA sobre la expresión de las proteínas de las TJ.	30
4. Planteamiento del problema.	32
5. Hipótesis.	33
6. Objetivo General.	33
7. Metodología.	34
7.1. Animales de experimentación.	34
7.2. Monitoreo del ciclo estral y apareamiento.	34
7.3. Tratamiento farmacológico de la generación F0.	35

7.4.	Caracterización fenotípica de la generación F1.	36
7.5.	Procesamiento de los tejidos.	37
7.6.	Estudio de la expresión de las Proteínas de las Uniones Estrechas.	38
8.	Resultados.	39
8.1.	Expresión de claudinas en el útero de ratas control durante los diferentes días de la gestación.	39
8.2.	Expresión en el día 1 de gestación (D1) de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA.	42
8.3.	Expresión en el día 3 de gestación (D3) de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA.	44
8.4.	Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 6 de gestación en los sitios de implantación (D6 SI).	46
8.5.	Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 6 de gestación en los sitios de no implantación (D6 SNI).	48
8.6.	Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 7 de gestación en los sitios de implantación (D7 SI).	50
8.7.	Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 7 de gestación en los sitios de no implantación (D7 SNI).	52
9.	Discusión.	54
10.	Conclusiones.	60
11.	Perspectivas.	60
12.	Referencias.	61
13.	Anexo 1.	73

ABREVIATURAS

BPA	Bisfenol A
BPA-L	Grupo tratado con dosis baja de BPA (0.05 mg/kg/día)
BPA-H	Grupo tratado con dosis alta de BPA (20 mg/kg/día)
CEU	Células del epitelio uterino
CI	Claudina
D1	Día 1 de gestación
D3	Día 3 de gestación
D6 SI	Sitios de implantación del día 6 de gestación
D6 SNI	Sitios de no implantación del día 6 de gestación
D7 SI	Sitios de implantación del día 7 de gestación
D7 SNI	Sitios de no implantación del día 7 de gestación
EDC	Disruptores endócrinos (<i>Endocrine Disrupting Chemicals</i>)
TJ	Proteínas de uniones estrechas (<i>Tight Junction</i>)
WHO	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)
ZO	Zonula occludens

1. Resumen

Debido al aumento en la exposición de los seres humanos a diversos disruptores endócrinos, como el bisfenol A (BPA), se han realizado muchos estudios con el fin de conocer los efectos adversos que ocasionan estos compuestos sobre el organismo y la salud reproductiva, así como los mecanismos de acción a nivel molecular a través de los cuales actúan.

En el presente proyecto se evaluó el efecto del BPA en las claudinas-3, -4 y -7 que conforman las uniones estrechas del epitelio uterino, las cuáles están relacionadas con la receptividad del útero. Por tal motivo, se administró BPA en dos diferentes dosis (0.05 mg/kg/día y 20 mg/kg/día) a ratas Wistar preñadas (F0) durante la gestación y posteriormente en la lactancia. De las crías, solo se utilizaron las hembras. Al madurar las hembras de la generación F1, se realizó la monta con machos fértiles que no fueron expuestos al BPA. Al quedar preñadas las hembras F1, se sacrificaron en los días 1, 3, 6 y 7 de gestación y se obtuvieron muestras de los úteros. En los días 6 y 7 de gestación se obtuvieron muestras tanto de sitios de implantación como de no implantación.

Se observaron diferencias en cuanto a la expresión y localización de las claudinas-3, -4 y -7 del epitelio uterino de los grupos de ratas tratadas con BPA comparándolos con un grupo control.

El bisfenol-A afectó de manera consistente la expresión de la claudina 4, la cual tiene un papel importante en la receptividad del útero al blastocisto, la dosis baja de BPA (0.05 mg/kg/día) provocó una expresión temprana durante la gestación, mientras que la dosis alta de BPA (20 mg/kg/día) provocó una expresión muy baja en el día de implantación.

Los efectos observados del bisfenol-A no siguen un modelo dosis-respuesta lineal ya que los disruptores endócrinos tienen diversos y complejos mecanismos de acción. Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que la alteración de la expresión de claudinas puede ser uno de los mecanismos de acción por el cual el bisfenol-A interfiere en la implantación del blastocisto en el epitelio uterino.

2. Introducción.

En la actualidad, la exposición a diversos compuestos químicos que alteran la homeostasis del cuerpo humano ha aumentado considerablemente en comparación con décadas anteriores. La industria, con el fin de tener mayores ganancias, utiliza compuestos y polímeros que son fáciles y económicos de producir sin importar el impacto que lleguen a tener en la salud de los consumidores.

Uno de los tantos compuestos que llegan a afectar al ser humano es el bisfenol A (BPA; Fig. 1), el cual es empleado en la producción de epóxidos, poliestireno y resinas de policarbonato que, a su vez, son utilizados en la elaboración de curaciones dentales, biberones, recubrimientos internos de latas para alimentos, botellas para bebidas y empaques alimentarios en general. Se ha demostrado que el BPA es capaz de migrar desde el recubrimiento del envase al alimento por lo que las personas que consumen alimentos en empaques que contienen BPA también ingieren, sin saberlo, el compuesto.

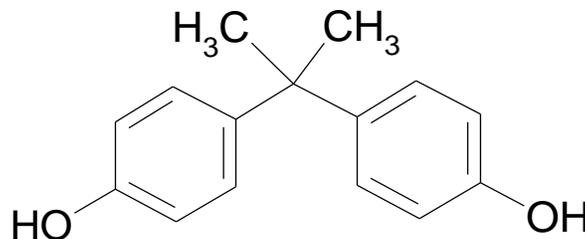


Figura 1. Estructura química del bisfenol A (BPA)

Existe una gran cantidad de estudios realizados del BPA en modelos animales que demuestran una gran variedad de efectos negativos, entre los cuáles están: alteración del ciclo estral, desarrollo anormal de órganos reproductivos y problemas de fertilidad.

En el presente trabajo se evalúa el efecto que tiene el BPA, al ser administrado a ratas Wistar de forma perinatal a dos dosis diferentes, en la expresión de proteínas de uniones estrechas (TJ): claudinas durante la gestación temprana, que comprende la remodelación del útero para prepararse para recibir el blastocisto a partir de la monta hasta el día de implantación.

3. Antecedentes.

3.1. Disruptores Endócrinos.

Los disruptores endócrinos, o EDC por sus siglas en inglés Endocrine Disrupting Chemicals, son una clase de compuestos que interfieren con el sistema endócrino que pueden producir efectos adversos en el desarrollo, en el sistema reproductivo, en el sistema nervioso y en el sistema inmune (NIEHS, 2016A).

Las personas pueden estar en contacto con EDCs a diario, durante varias etapas de su vida, desde su concepción y su desarrollo fetal hasta la edad adulta y la senectud. Una característica que diferencia a los EDCs de otros productos químicos tóxicos ambientales, es que estas sustancias ejercen efectos a pequeñas dosis y varían en función al tiempo de exposición. Por lo tanto, estos niveles de exposición aparentemente menores ejercen cambios sutiles en los niveles moleculares y celulares que finalmente inducen efectos fisiopatológicos más graves (Prusinski, 2016).

Los EDS también han sido relacionados con un aumento de la incidencia de cáncer de mama, crecimiento anormal y retraso neurológico en los niños (WHO, 2016A). Una amplia gama de sustancias, tanto naturales como artificiales, pueden provocar alteraciones endócrinas, como medicamentos, dioxinas, bifenilos policlorados, DDT, pesticidas, y plastificantes como el BPA. Los disruptores endocrinos pueden encontrarse en muchos productos de uso diario, incluyendo botellas de plástico, latas de metal de alimentos, detergentes, contenedores de alimentos, juguetes, cosméticos y pesticidas.

A partir de estudios con animales se han observado los mecanismos mediante los cuales los disruptores endocrinos afectan al sistema endócrino. Los disruptores endócrinos pueden (NIEHS, 2016A):

- Imitar el efecto que tienen las hormonas que se producen de forma natural en el cuerpo, como estrógenos y andrógenos.

- Unirse a receptores dentro de la célula y bloquear la unión de la hormona endógena, lo que provoca que la señal normal no se produzca y el cuerpo no responda de forma adecuada.
- Interferir o bloquear la vía de señalización de las hormonas.

3.2. Generalidades del Bisfenol A.

El bisfenol A (2,2-bis(4-hidroxifenil)propano) (BPA) es una sustancia química utilizada fundamentalmente como monómero en la producción de plástico de policarbonato y resinas epoxi. También se utiliza en la fabricación de resinas de poliéster, polisulfona y poliacrilato y de retardadores de llama.

El policarbonato se utiliza ampliamente en la fabricación de materiales en contacto con alimentos, como biberones, vajillas, utensilios de horno y microondas, envases de alimentos, botellas de agua, leche y otras bebidas, equipos de procesamiento y tuberías de agua. Las resinas epoxi se usan como revestimiento de protección de diversas latas de alimentos y bebidas, y como revestimiento de las tapas metálicas de jarras y botellas de vidrio, incluidos los envases de las preparaciones para lactantes. Estos usos provocan la exposición de los consumidores al BPA a través de la alimentación.

El BPA es uno de los productos químicos que se producen en grandes volúmenes a nivel mundial, estimaciones recientes indican que se producen alrededor de 8 billones de libras cada año, de los cuales 100 toneladas se liberan a la atmósfera (Vandenberg et al., 2010).

La principal fuente de exposición de las personas al BPA es a través de la dieta. El BPA contenido en los envases de bebidas y alimentos es la fuente de exposición del ser humano a diario, ya que el BPA puede filtrarse a los alimentos de los revestimientos de resina epoxi presentes en contenedores de alimentos, botellas de agua y biberones. El grado en que el BPA se filtra a partir de botellas de policarbonato depende de la temperatura del líquido contenido y la edad del contenedor (NIEHS, 2016B).

Otra fuente de exposición es el papel térmico en personas mayores de 3 años. La exposición al BPA mediante contaminación ambiental puede ocurrir durante la producción, procesamiento, vía de degradación física o química de los productos finales de la eliminación de sustancias que contienen BPA o en el reciclaje (Corrales et al., 2015).

El BPA ha sido detectado tanto en el suero materno y el fluido ovárico folicular, como en el fluido amniótico y en el plasma fetal, lo que indica que tiene la capacidad de cruzar la placenta durante el embarazo (Schonfelder et al., 2002).

Algunas medidas de prevención para reducir la exposición al BPA son:

- No usar envases de plástico de policarbonato en el Horno de Microondas. El policarbonato es resistente y duradero pero con el paso del tiempo puede degradarse y más si se expone a altas temperaturas.
- Reducir el uso de alimentos enlatados.
- Cuando sea posible, utilizar vidrio, porcelana o acero inoxidable para alimentos o bebidas calientes.
- Usar biberones y botellas libres de BPA.

3.3. Efectos adversos del BPA.

Los niveles altos de BPA urinarios en adultos han sido relacionados con varias enfermedades y condiciones médicas. A la fecha, se reportan complicaciones de salud asociadas con niveles altos de exposición del BPA como diabetes (Lang et al., 2008), lo cual es congruente con el reporte de que los niveles bajos de BPA inhiben la liberación de adiponectina del tejido adiposo (Hugo et al., 2008), enfermedades cardiovasculares (Lang et al., 2008), y alteraciones en las enzimas hepáticas (Hugo et al., 2008). También se ha reportado una relación entre niveles altos de BPA en el suero de mujeres y abortos recurrentes involuntarios (Sugiura et al., 2005), y un mayor número de partos prematuros (Cantonwine et al., 2010).

Los efectos del BPA varían dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. Los períodos prenatal y neonatal representan la ventana de exposición más vulnerable (Vanderberg et al., 2009).

En mujeres bajo tratamiento de fertilización *in vitro*, el aumento de los niveles de BPA se han relacionado con el descenso de los niveles máximos de estradiol y la disminución de la recuperación de ovocitos (Mok-Lin et al., 2010), y en mujeres post-menopáusicas, el ascenso de los niveles de BPA se asocian con un aumento en la inflamación y estrés oxidativo (Yang et al., 2009). En hombres, los niveles altos de BPA están relacionados con un descenso en la calidad del semen y daño del DNA del espermatozoide (Meeker et al., 2010).

En modelos con roedores se estableció que la dosis más baja que ocasiona efectos adversos (LOAEL) es de 50 mg BPA/kg/día. Algunos de los efectos de la exposición del BPA durante el desarrollo a dosis más bajas que LOAEL son: alteración en el tiempo de pubertad; alteración del ciclo estral; alteraciones en la próstata, incluidas las neoplasias; alteración en el desarrollo de glándulas mamarias; cambios en el útero y ovarios; alteraciones en el dimorfismo sexual; cambios en el cerebro, alteración de los niveles de receptores esteroideos y factores de transcripción en el cerebro; cambios en el comportamiento: hiperactividad y agresividad; aumenta la susceptibilidad a medicamentos de adicción; alteración en el peso y composición corporal y alteración en la homeostasis de la glucosa (Rubin, 2011).

En algunos tejidos, se requieren niveles mayores de BPA en adultos en relación con los niveles requeridos durante la organogénesis y/o lactancia para inducir efectos significativos. Por ejemplo, las dosis de BPA requeridas para inducir una respuesta uterotrónica (100 mg/kg) o un incremento en las células del epitelio uterino (5 mg/kg) en hembras ovariectomizadas de roedores, fueron mucho mayores que la dosis capaz de ejercer efectos duraderos durante la exposición ocurrida en la gestación (0.25 µg/kg/día de gestación) (Markey et al., 2005).

En contraste con el útero, niveles bajos de BPA ejercen efectos en el páncreas del adulto. Una sola exposición de 10 o de 100 µg/kg rápidamente disminuye los niveles de glucosa y aumenta el nivel de insulina en la sangre de ratones machos. Después de 2 días de la exposición, se

aumentó el contenido de insulina pancreática, y después de 4 días del tratamiento, los ratones desarrollaron hiperinsulinemia crónica y alteración en la tolerancia a la insulina y glucosa (Alonso et al., 2006). También se han observado efectos en la homeostasis de la glucosa en hembras de ratón preñadas expuestas a dosis similares de BPA en los días 9-16 de gestación (Alonso et al., 2010).

Taylor y colaboradores, realizaron un estudio en fetos y recién nacidos de primates y roedores que sugiere que poseen una habilidad limitada de metabolizar el BPA, lo que ocasiona que dicho compuesto sea perjudicial durante la etapa crítica del desarrollo (Taylor et al., 2011).

Estudios realizados en animales de laboratorio, han reportado una relación entre la exposición al BPA y cambios en la estructura y función del cerebro, alteraciones en la metilación del DNA al disminuir la actividad de las DNA-metiltransferasas y problemas de comportamiento (incluidos ansiedad y agresividad) (Wolstenholme et al., 2011).

El BPA puede alterar la programación de células y tejidos mediante mecanismos epigenéticos que inducen a largo plazo, cambios en la estructura de la cromatina y en la expresión de genes (Kundakovic et al., 2011). El BPA induce cambios en la metilación de islas CpG, modificaciones en las histonas y desregulación de la expresión de RNAs no codificantes (Hochberg et al., 2011).

En ratones, la exposición prenatal en los días 1 al 19 de gestación a una dosis 200 µg/kg/día de BPA induce cambios en la metilación del DNA en la región transcripcional del gen que codifica el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual ejerce una función importante en el desarrollo fetal del cerebro; estos resultados concuerdan con los cambios del BDNF en la sangre de cordón umbilical de bebés expuestos al BPA en el útero (Kundakovic et al., 2015). Del mismo modo, se han observado varios efectos adversos que ocurren de manera dosis-respuesta lineal al utilizar dosis de 2, 20 y 200 µg/kg/día de BPA en la metilación del DNA y en la expresión de genes, que dependen de la vía de señalización de estrógeno (Kundakovic et al., 2013).

Los efectos del BPA sobre la generación de sinapsis han sido demostrados en cerebros de ratas adultas y de primates. Se encontró que el BPA impide los efectos de los estrógenos y andrógenos sobre la inducción de la sinapsis vertebral en el hipocampo y en la corteza prefrontal. La reducción en el número de sinapsis observada en los animales tratados con BPA podría tener una implicación importante en la función y deterioro cognitivo (Hajszan et al., 2010).

Estudios epidemiológicos han encontrado diferencias sexuales específicas en el comportamiento de los niños asociadas con el aumento en las concentraciones prenatales maternas de BPA (Perera et al., 2012). También se ha encontrado que la exposición al BPA interfiere en la homeostasis inmunológica, comprometiendo la habilidad del sistema inmunológico de luchar contra infecciones (Carlisle et al., 2009).

En particular, varios estudios *in vitro* y en animales han examinado los efectos de la exposición a BPA en la proliferación de linfocitos, degranulación de mastocitos y las respuestas de anticuerpos, con resultados que muestran que el sistema inmunológico en desarrollo puede ser un objetivo particularmente sensible del BPA (Narita et al., 2006; Yan et al., 2008; Yoshino et al., 2004).

El BPA también está relacionado con anormalidades en la función de los órganos reproductivos, en la mujer provoca alteración del ciclo menstrual, formación de ovario poliquístico, disfunción placentaria, aumento de la incidencia de abortos espontáneos, mortalidad neonatal y pubertad precoz. En el hombre puede provocar disfunción sexual que incluye disminución de la libido, disfunción eréctil, dificultades para eyacular y alteración en los parámetros del semen (Hunt et al., 2009; Manfo et al., 2014).

La incidencia y prevalencia de cáncer de órganos diana del sistema endócrino, incluidos la próstata, mama y testículos, comenzó a aumentar constantemente en 1970 y alcanzó una meseta elevada en el 2002 (Howlander et al., 2014). El incremento de la exposición a estrógenos sintéticos ambientales, como el BPA, ha sido considerado como factor que contribuye al aumento de esta incidencia (Maffini et al., 2006). Por ejemplo, el BPA ejerce

efectos marcados en el desarrollo de las glándulas mamarias (Muñoz et al., 2005) y promueve la formación de hiperplasias y lesiones mamarias pre-cancerígenas en roedores adultos (Murray et al., 2007; Vanderberg et al., 2008).

3.4. Impacto del BPA en la fertilidad humana.

La Organización Mundial de la Salud define a la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que consiste en el fracaso de un embarazo clínico después de 12 meses o más de tener relaciones sexuales regulares sin protección (WHO, 2016B). La infertilidad es un problema que ha aumentado de manera considerable en los últimos años. El porcentaje de mujeres infértiles a nivel mundial alcanzó el 30% (Inhorn et al., 2015).

La infertilidad en las mujeres puede ser resultado de varios factores, incluyendo problemas físicos, problemas endócrinos, estilo de vida y factores ambientales. Los factores ambientales, tales como la exposición a productos químicos con propiedades de disruptores endócrinos, pueden imitar o bloquear la actividad endócrina de hormonas endógenas y por lo tanto, afecta la reproducción.

Estudios epidemiológicos han encontrado que los niveles de BPA en el suero son mayores en mujeres infértiles que en mujeres fértiles (Caserta et al., 2013A; La Rocca et al., 2014). El centro de Salud Reproductiva de la Universidad de California, examinó un grupo de parejas bajo tratamiento de fertilización *in vitro* y encontró una asociación entre un nivel sérico alto de BPA no conjugado con un nivel bajo de estradiol después de la hiperestimulación con la hormona gonadotropina coriónica (Bloom et al., 2011).

En un estudio realizado en parejas asiáticas y americanas, encontraron que la probabilidad de fertilización disminuyó un 55% cuando la mujer tenía niveles altos de BPA no conjugado, y disminuyó 6% más cuando se detectaron niveles séricos de BPA tanto en el hombre como en la mujer, aunque en parejas donde solo el hombre ha tenido exposición al BPA esto no ha sido un factor significativo (Fujimoto et al., 2011).

3.4.1. Efecto del BPA en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Para entender el papel del BPA sobre la capacidad reproductiva femenina, es importante considerar las alteraciones potenciales asociadas a la exposición temprana de BPA en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, así como en el tracto reproductivo y las glándulas mamarias.

Después de la maduración sexual, la retroalimentación coordinada del eje hipotálamo-hipófisis-gonada controla la capacidad de las hembras mamíferas para ovular y preparar los órganos reproductivos para soportar el posible embarazo. En el hipotálamo, las hormonas sexuales (estradiol (E_2) y progesterona) activan las neuronas kisspeptinas que a su vez estimulan la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH estimula a la hipófisis para secretar hormonas gonadotróficas (hormona folículo estimulante, FSH, y hormona luteinizante, LH). La FSH y la LH actúan sobre el ovario para apoyar la foliculogénesis. El aumento de los niveles de hormonas sexuales sintetizadas por el ovario retroalimenta a las neuronas kisspeptinas para inducir un aumento de LH, el cual es necesario para la ovulación.

La exposición neonatal al BPA aumenta (Xi et al., 2011; Qiu et al., 2016) o disminuye la expresión de Kiss1 (Navarro et al., 2009; Cao et al., 2012), gen que codifica las kisspeptinas, en peces, ratones y ratas. Diferencias en especies y edad pueden explicar estos resultados opuestos. Además, el BPA aumenta los niveles de FSH, LH, E_2 y GnRH (Wang et al., 2014), y disminuye los receptores a estrógenos α (Esr1) y β (Esr2) en el hipotálamo (Cao et al., 2012; Cao et al., 2014), en ratas.

A nivel del hipotálamo, la exposición al BPA a una dosis de 20 mg/kg/día en los días 1 al 7 postnatales, durante la diferenciación sexual del cerebro, causa cambios en el tamaño y composición del núcleo periventricular anteroventral, una región esencial para la liberación de GnRH (Monje et al., 2010). Se han reportado cambios en la liberación de LH y en la función del hipotálamo y la hipófisis en ratas expuestas de manera temprana al BPA (Fernández et al., 2009), así como también cambios en los niveles de los receptores de estrógenos (Esr1 y Esr2) en la hipófisis anterior y en el hipotálamo (Khurana et al., 2000; Ramos et al., 2003).

Así mismo, un estudio realizado en ratones, encontró que una exposición a dosis baja de BPA (0.5 µg/kg/día) durante la gestación aumentó la proliferación de las células hipofisarias e incrementó el número de células gonadotróficas (Brannick et al., 2012). Una exposición más larga al BPA, de la gestación al destete, y con una mayor dosis (10 mg/kg/día), disminuyó los niveles de FSH (Xi et al., 2011), lo que indica que el efecto que ejerce la exposición del BPA en la hipófisis depende del tiempo de exposición y la dosis.

Otro órgano fundamental en la fertilidad femenina es el ovario, el cuál es el encargado de producir óvulos y hormonas sexuales que regulan el ciclo estral y la fertilidad. Diversos estudios indican que la exposición in útero o neonatal a BPA resulta en morfología e histología ovárica anormal.

De manera específica, en monos Rhesus, la exposición a una dosis de 400 µg/kg/día de BPA durante el día 50 al 100 de gestación aumentó el número de folículos multi-ovocitos (Hunt et al., 2012), inhibió la apertura de los nidos de las células germinales (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2012), disminuyó el número de folículos primordiales (Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2014), aumentó la apoptosis de los ovocitos (Zhang et al., 2014) e incrementó el reclutamiento de folículos primordiales (Wang et al., 2014; Rodríguez et al., 2010). También afectó la distribución de los folículos al reducir el número de folículos antrales y aumentar el número de folículos primarios y secundarios (Gamez et al., 2015). Esto se debe a que la exposición al BPA disminuye la expresión de factores que controlan la foliculogénesis, tales como Nobox, Lhx8, Sohlh2, Stra8, Dmc1, Rec8, Scp3 y Figlα (Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2014).

El BPA afecta la meiosis en los ovarios, acelera la transición folicular, reduce la calidad de los oocitos en modelos animales y en mujeres bajo fertilización *in vitro*, afecta la proliferación del endometrio uterino, disminuye la receptividad uterina y aumenta la falla en la implantación (Caserta et al., 2014, Peretz et al., 2014).

La exposición a dosis baja de BPA aumenta la apoptosis en folículos ováricos que esta acoplada a un incremento en el nivel de caspasa-3 (Lee et al., 2013). Este aumento en la

apoptosis de los folículos podría explicar la disminución de óvulos maduros en mujeres expuestas al BPA.

Análisis moleculares revelaron que el BPA afecta la expresión de los genes relacionados con la apoptosis en el ovario; como Bcl2, Bak1, TNF, Tnfrsf11b y Ltbr (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2014).

Así mismo, estudios realizados sobre la expresión de genes, sugieren que el BPA puede actuar a través de mecanismos que implican la alteración de los niveles de microRNAs (Veiga-López et al., 2013). El BPA regula a la baja la expresión de miR-137 lo que conlleva a una disminución en la síntesis de hormonas sexuales (Sirotkin et al., 2009) y miR-765 que está involucrado con la falla ovárica prematura (Yang et al., 2012).

3.4.2. Efecto del BPA en el útero.

Durante el desarrollo, el BPA puede alterar la morfología del útero incrementando la expresión de receptores esteroideos (Markey et al., 2005) y aumentando la sensibilidad a los estrógenos (Bromer et al., 2010).

En el útero, la exposición de BPA a una dosis de 0.1 mg/kg/día, en los primeros 5 días después del nacimiento, resulta en la aparición de lesiones proliferativas progresivas en el oviducto y en el remanente del conducto de Wolff durante la etapa adulta y aumenta la incidencia de ovarios poliquísticos (Newbold et al., 2007). Además, otros estudios indican que dosis altas de BPA (100 mg/kg/día) provocan en el útero un retraso en el desarrollo y transporte del embrión comparado con los controles (Xiao et al., 2011).

En ratas, una dosis baja de BPA (0.5 µg/kg/día), administrada del día 9 de gestación al destete, incrementó las anomalías en el epitelio luminal y glandular (Viguzzi et al., 2015); y provocó hiperplasia uterina, pólipos estromales y retención de remanentes del ducto de Wolff en descendencia adulta comparado con los controles (Newbold et al., 2009). La exposición a una dosis alta de BPA (50 µg/kg/día) reduce el peso uterino en la segunda generación de crías

(Hiyama et al., 2011). Estos resultados coincidieron con otro experimento en el que se administró una sola dosis de BPA (100 mg/kg) a ratones recién nacidos, que cuando llegaron a la edad adulta se encontró una reducción en el peso uterino comparado con los animales control (Nah et al., 2011).

En ratas jóvenes que entran a la etapa adulta, la exposición a una dosis baja de BPA (1.2 mg/kg/día) del día 6 de gestación hasta el día del destete incrementó el grosor del epitelio uterino y del estroma (Mendoza-Rodríguez et al., 2011).

Un estudio reciente demostró que la exposición a dosis baja de BPA disminuyó los niveles uterinos de Lif, PR, Hand2, y Hoxa10 comparados con los controles. Estos efectos mediados por el BPA pueden afectar la fertilidad debido a que estos factores forman parte de la vía de señalización mediada por la progesterona y son importantes en la receptividad e implantación uterina (Li et al., 2016). Otros factores moleculares en el útero que se observan alterados después de la exposición a BPA *in vivo* son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), Esr1 y Esr2 y PR (Aldad et al., 2011; Bosquiazzo et al., 2010; Kim et al., 2014; Varayoud et al., 2011).

Al final del embarazo, el útero necesita contraerse para inducir la labor de parto. Las contracciones están bajo el control de hormonas endógenas como estradiol, progesterona, oxitocina y las prostaglandinas. La exposición a BPA disminuye las contracciones uterinas y altera los niveles de los factores de transcripción y proteínas asociados a la contracción. Específicamente la dosis alta de BPA (500 mg/kg/día) aumenta la oxitocina y su receptor, y disminuye la señalización dependiente de prostaglandinas (An et al., 2013).

Estudios *in vitro* realizados en líneas celulares humanas, indican que la exposición a una concentración de BPA de 100 $\mu\text{mol/L}$ disminuye la proliferación de células epiteliales (Aghajanova et al., 2011) y aumenta la proliferación de células estromales durante la deciduización estromal (Manelli et al., 2015). Algunos de los mecanismos potenciales a través de los cuáles el BPA puede afectar la proliferación celular en el útero incluyen la alteración de la expresión de IGFBP1, MIF, HOXA10, receptores hormonales (Esr y PR),

enzimas (Citocromo P450 CYP11A1, deshidrogenasas HSD17B1 y HSD17B2) y hormonas (PRL, LH) (Aghajanova et al., 2011; Aldad et al., 2011; Forte et al., 2016; Hiyama et al., 2011; Manelli et al., 2015).

El ciclo estral es crucial para la ovulación y la preparación del útero para la posible implantación. La exposición en ratones neonatos a BPA, a dosis bajas (0.1-10 mg/kg/día) y altas (25-100 mg/kg/día), aumentan o disminuyen los días del estro y alteran el ciclo en ratones y ratas adultas comparados con los controles (Fernández et al., 2009; Lee et al., 2013; Nah et al., 2011).

3.4.3. Efecto del BPA en la gestación.

Se encontró en un estudio realizado en ratones, que la exposición a una dosis de 10.125 mg/día de BPA durante el período de preimplantación (días 1-4 de gestación) reduce el número y tamaño de las camadas comparadas con los controles (Berger et al., 2007). Además, la exposición a una dosis baja de BPA (0.5 µg/kg/día) después de la implantación del blastocisto (Fig.3) al nacimiento afecta la fertilidad de las hembras en la generación posterior, disminuyendo el número de crías por camada y aumentando el porcentaje de crías muertas (Wang et al., 2014). Estos resultados coinciden con los encontrados por Cabaton y colaboradores, quienes afirman que las crías hembras expuestas a dosis bajas de BPA (25 µg/kg/día) durante el día 8 de gestación y el día 16 de lactancia tienen menos embarazos y menor número de crías en cada camada (Cabaton et al., 2011).

3.4.4. Efecto del BPA en la implantación del blastocisto.

Un estudio realizado en el Centro de Fertilidad del Hospital General de Boston en 137 mujeres bajo tratamiento de fertilización *in vitro* demostró que niveles altos de BPA en la orina está asociado con el fracaso de la implantación, el cuál definieron como una prueba negativa de la hormona gonadotropina coriónica (<6 UI/L) 17 días después de la recuperación del óvulo (Ehrlich et al., 2012). Para la invasión apropiada de blastocistos, la implantación y el embarazo exitoso, el endometrio uterino se transforma y se reorganiza bajo la influencia de los

estrógenos provenientes del folículo en crecimiento, el espesor endometrial aumenta rápidamente entre el quinto y el decimocuarto días del ciclo menstrual. Conforme el espesor se incrementa, las glándulas uterinas aumentan de longitud, tales cambios endometriales forman parte de la fase proliferativa. Después de la ovulación, el endometrio adquiere gran vascularidad y se edematiza ligeramente bajo la influencia de los estrógenos y la progesterona provenientes del cuerpo lúteo, como consecuencia, esta fase del ciclo se conoce como fase secretora o lútea. Así las sustancias químicas que interfieren con la función uterina tienen el potencial de afectar la fertilidad de forma adversa (Ganong et al., 2012; Fig. 2).

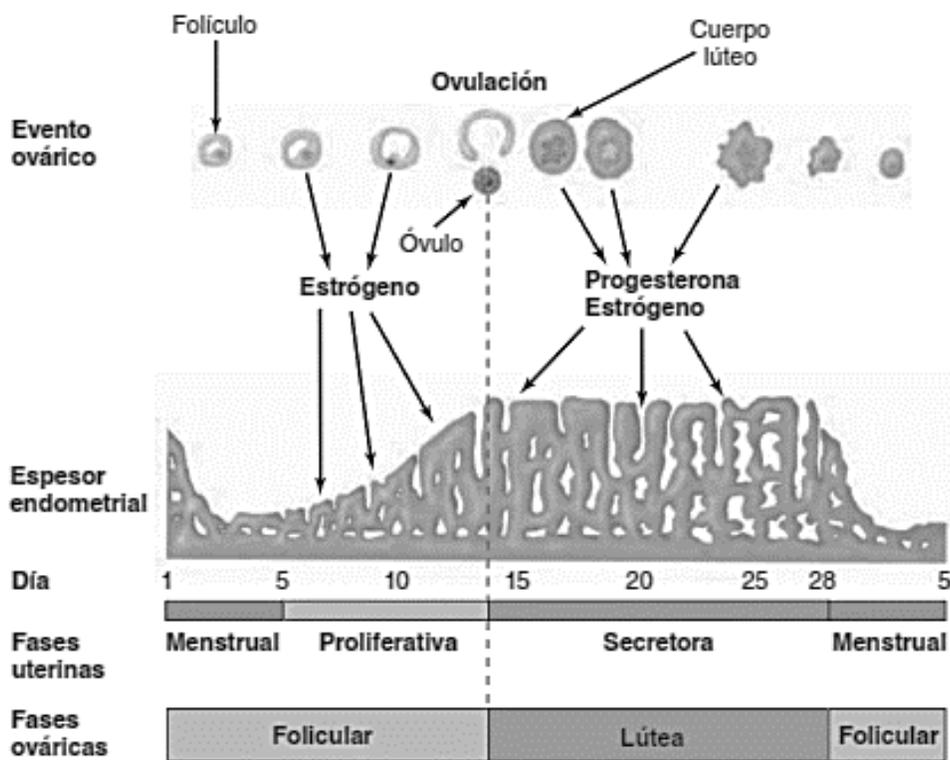


Figura 2. Relación entre los cambios ováricos y uterinos durante el ciclo menstrual de la mujer.

El blastocisto es capaz de unirse a diferentes sitios y superficies del organismo materno, pero el epitelio uterino es el más selectivo, permitiendo la implantación del embrión solamente en un período corto de tiempo, llamado ventana de implantación (Norwitz et al., 2001). La implantación del blastocisto en el útero es un proceso fundamental en la fertilidad. En el humano ocurre de 6-7 días después de la fecundación del óvulo (Fig. 3). Las células del

trofoblasto expresan proteínas de adhesión en su superficie para unirse a la superficie del epitelio uterino.

Esquemáticamente, este proceso se divide en 3 etapas (Bruce 1994):

- Aposición del blastocisto sobre el endometrio.

Cuando el blastocisto emerge de la zona pelúcida en el día 5 después de la fertilización del óvulo, entra en contacto con la mucosa uterina materna. El contacto puede ocurrir cuando el útero entra en su fase secretora (fase luteinizante). Esta fase alista al endometrio para la recepción y tiene una duración de 4 días en la mujer. Ocurre alrededor de 6 días después del pico de LH y se caracteriza por la aparición de pequeñas elevaciones en el polo apical de las células del endometrio. Una de las funciones de estas elevaciones consiste en la absorción del fluido uterino, que lleva al blastocisto más cerca del endometrio y lo inmoviliza al mismo tiempo. En esta etapa el blastocisto todavía puede eliminarse por un lavado.

- Adhesión del blastocisto.

Después de la aposición del blastocisto en el epitelio uterino, las microvellosidades de la superficie del trofoblasto interactúan con las células epiteliales del útero. La adhesión surge a través de las glicoproteínas de la superficie celular.

- Invasión del trofoblasto e inserción.

El trofoblasto se diferencia en dos diferentes masas celulares: el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto. El citotrofoblasto, consiste en una capa interna irregular de células ovoides de un solo núcleo. También es allí donde se desarrolla la actividad mitótica intensiva. En la periferia, el sincitiotrofoblasto forma un sincitio, es decir, una capa multinuclear sin límites celulares que surge de la fusión de las células del citotrofoblasto. El sincitiotrofoblasto produce enzimas líticas y secreta factores que causan apoptosis de las células epiteliales endometriales. El sincitiotrofoblasto también atraviesa la lámina basal y penetra en el estroma que se encuentra por debajo, erosionando la pared de los capilares. Con la implantación del blastocisto en el endometrio, el sincitiotrofoblasto se desarrolla

rápidamente y rodeará totalmente al embrión tan pronto como se haya incrustado completamente en el endometrio.

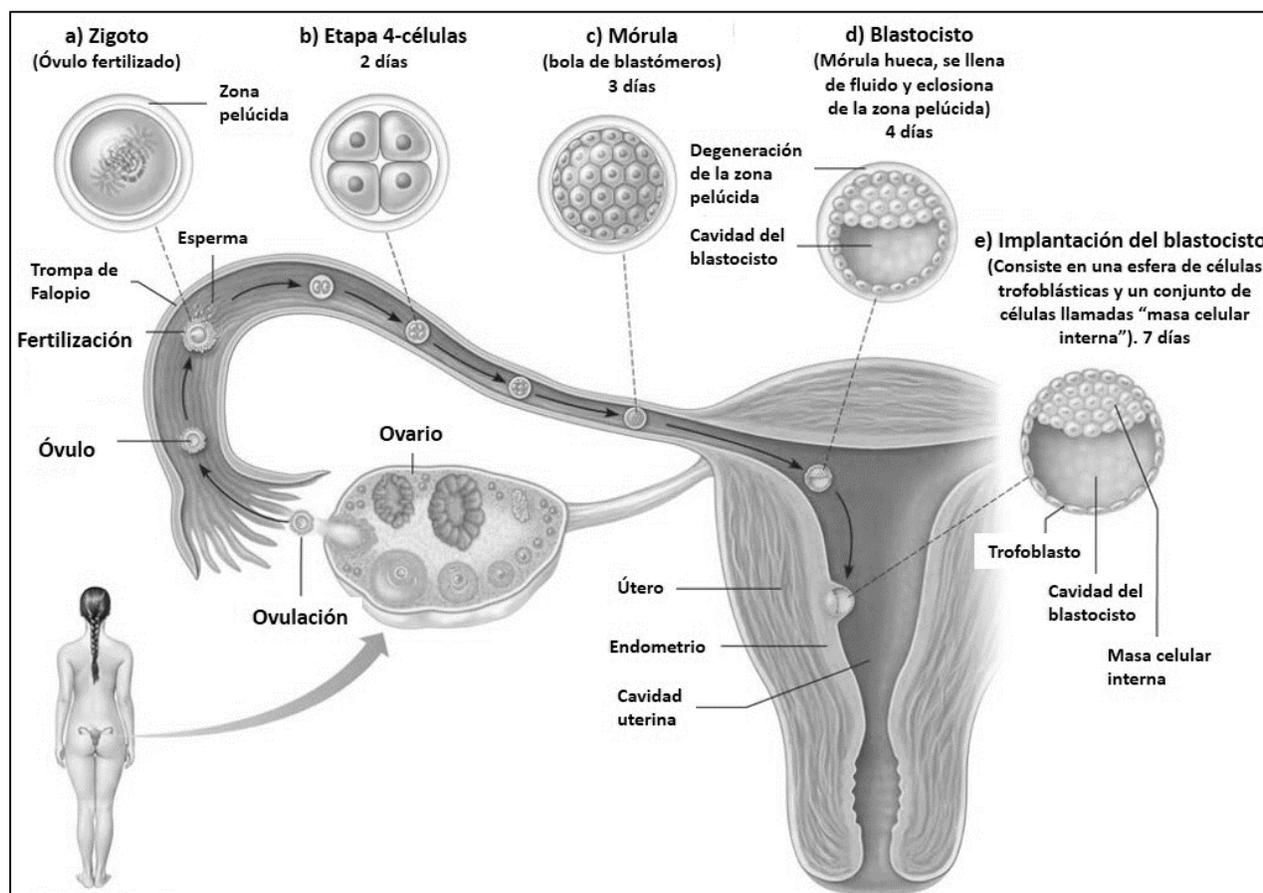


Figura 3. Desarrollo embrionario temprano en el ser humano. Después de 24h después de la fertilización (a) ocurre la primera división celular. A las 48h el embrión está formado por 4 células (b) y continúan las divisiones hasta formar la mórula que contiene aprox. 32 células (c). Después se forman una capa celular epitelial, más gruesa en el exterior, y una cavidad en el interior del blastocisto (d). El blastocisto sale de la zona pelúcida y se implanta en el endotelio uterino (e). Las células que conforman la masa celular interna son las que desarrollarán el embrión.

En ratas, la adhesión y la invasión del blastocisto ocurren en el día 6 y 7 de la gestación (Rogers et al., 1992).

Varios tipos de proteínas actúan como mediadores de la implantación del blastocisto, tales como transductores de señales intracelulares, factores de crecimiento y diferenciación, receptores de membrana y moléculas de adhesión celular (Anchache et al., 2006). Además,

estas proteínas son responsables de la diferenciación del endometrio, lo que facilita la adhesión e invasión del embrión, y mantiene el medio intercelular (Dietrich et al., 2007).

Otra función clave del epitelio luminal uterino es que cuando está en su etapa no receptiva forma una barrera intacta que es refractaria a elementos invasivos, incluyendo al blastocisto (Murphy et al., 1994; Psychoyos 1986). Durante la implantación, bajo condiciones de estrógeno, en especial estradiol, esta barrera experimenta grandes cambios estructurales y morfológicos para formar un epitelio modificado receptivo a la fijación de blastocistos y su acceso posterior al estroma (Psychoyos 1976).

Es importante entender el proceso natural de la remodelación de la barrera epitelial uterina para poder comprender los posibles fracasos durante el proceso de implantación y los factores que contribuyen a la infertilidad.

Se ha encontrado que el BPA ejerce cambios en la receptividad del endometrio a embriones durante la ventana de implantación. También influye en el desarrollo del blastocisto antes de la implantación, lo que lleva a la pérdida de la capacidad de invasión del blastocisto en el endometrio (Xiao et al., 2011). En el estudio realizado por Xiao en ratones, inyectaron vía subcutánea BPA (100 mg/kg/día) en los días 0.5, 1.5, 2.5 y 3.5 de gestación y encontraron que inhibía la implantación de los embriones.

Otro estudio realizado en ratones, encontró que dosis altas de BPA (600 y 800 mg/kg/día), administradas del día 0.5 hasta el día 3.5 de gestación, dañaron el desarrollo del blastocisto, aumentaron la cantidad de células apoptóticas por embrión y la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS), y alteraron la capacidad de invasión del blastocisto, con lo que suprime la implantación embrionaria (Xiaoyan et al., 2015).

En nuestro laboratorio hemos estudiado el efecto que tiene la administración de dosis bajas (0.05 mg/kg/día) y altas (20 mg/kg/día) de BPA a la generación F0 de ratas Wistar a partir del día 6 de la gestación hasta el día 21 de la lactancia sobre la tasa de implantación de la generación F1. Esto es, la generación F1 recibió el BPA mientras se encontraba en útero y

después durante la lactancia a través de la leche materna. Una vez destetadas las crías, estas se alimentaron con agua sin BPA hasta que llegaron a la etapa adulta. Una vez que llegaron a la etapa adulta fueron apareadas y se evaluó la tasa de implantación en el día 6 y 7 de la gestación (Fig. 4). Se observó que la exposición perinatal a la dosis alta del BPA provocó una disminución significativa en el número de sitios de implantación de la generación F1 (Martínez-Peña et al., 2017).

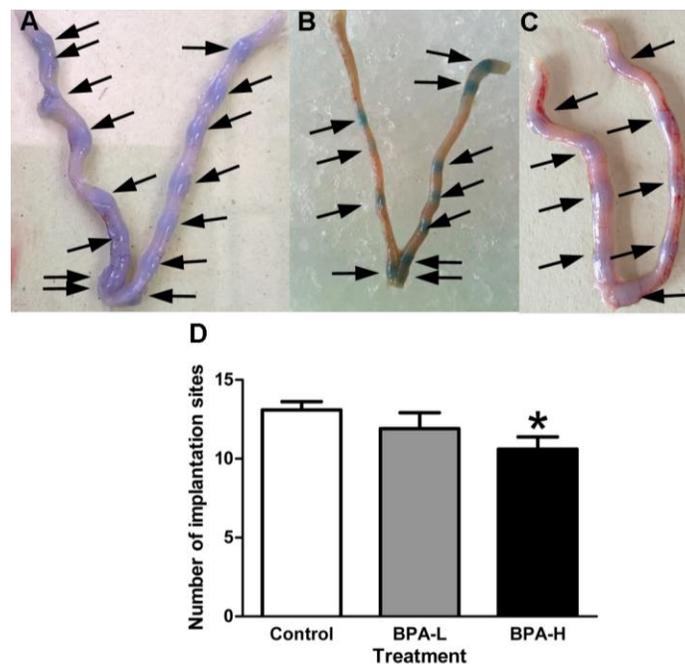


Figura 4. El tratamiento con BPA disminuye los sitios de implantación. Los sitios de implantación, detectados por una coloración azul, fueron evaluados al sacrificar los animales en los días 6 y 7 de gestación, grupo control (A), BPA-L (B) y BPA-H (C). Cinco animales fueron evaluados en cada grupo por cada día de gestación. El gráfico D muestra la media \pm SEM de cada tratamiento; Ambos días del tratamiento se agrupan. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, $P < 0,05$ en comparación con el grupo control.

3.5. Proteínas de Uniones Estrechas (TJ).

El epitelio es una capa de células que recubren las cavidades corporales y superficies externas en organismos multicelulares. El epitelio permite el transporte selectivo de solutos y agua entre compartimientos. El transporte transepitelial puede ocurrir por dos vías: la transcelular, que

ocurre a través de la célula, cruzando la membrana apical y basolateral; y la paracelular, que se refiere al transporte entre células.

Las células epiteliales están unidas entre sí mediante un complejo de uniones intercelulares anclado a sus membranas (Farquhar et al., 1963). Las uniones intercelulares más apicales son las uniones estrechas (TJ, *por sus siglas en inglés: Tight Junction*), las cuales conforman la principal determinante de la permeabilidad paracelular.

La primera proteína de TJ que fue descubierta fue zonula occludens-1 (ZO-1) en 1986 (Stevenson et al., 1986). Las uniones estrechas forman una barrera intercelular continua entre células epiteliales, la cual se necesita para separar el espacio entre las células y regular el transporte selectivo de solutos a través del epitelio (Anderson et al., 2009).

Se ha propuesto que las TJ tienen otra función, la cual es actuar como una cerca dentro de la membrana celular para restringir mecánicamente la difusión de proteínas y lípidos dentro de la bicapa lipídica (Diamond, 1977). Dicha cerca asegura que los componentes lipídicos y proteínas de la membrana plasmática permanezcan separados de los dominios de las TJ en la parte apical y basolateral, lo cual es un prerrequisito para el transporte transepitelial direccional (Günzel, et al., 2013).

Las TJ se conforman por un complejo de múltiples proteínas que incluyen proteínas transmembranales, proteínas citoplásmicas, proteínas de señalización y proteínas que las unen al citoesqueleto de actina (Fig. 5). Las proteínas transmembranales son los únicos componentes que tienen dominios transmembranales y porciones extracelulares, por lo que es probable que medien las tres funciones principales de las TJs: barrera, poro y cerca.

Las proteínas transmembranales de TJ se dividen en tres grupos (Günzel et al., 2013):

- Proteínas de un dominio transmembranal, incluye molécula de adhesión de unión (JAM), proteína Crumbs homóloga 3 (Crb3) y receptor de adenovirus y cocksavirus (CAR).

- Proteínas de 3 dominios transmembranales, como sustancia epicárdica de los vasos sanguíneos (Bves).
- Proteínas de 4 dominios transmembranales: claudinas y uniones estrechas asociadas a proteínas MARVEL (TAMP) que incluyen ocludina, tricelulina y MarvelD3.

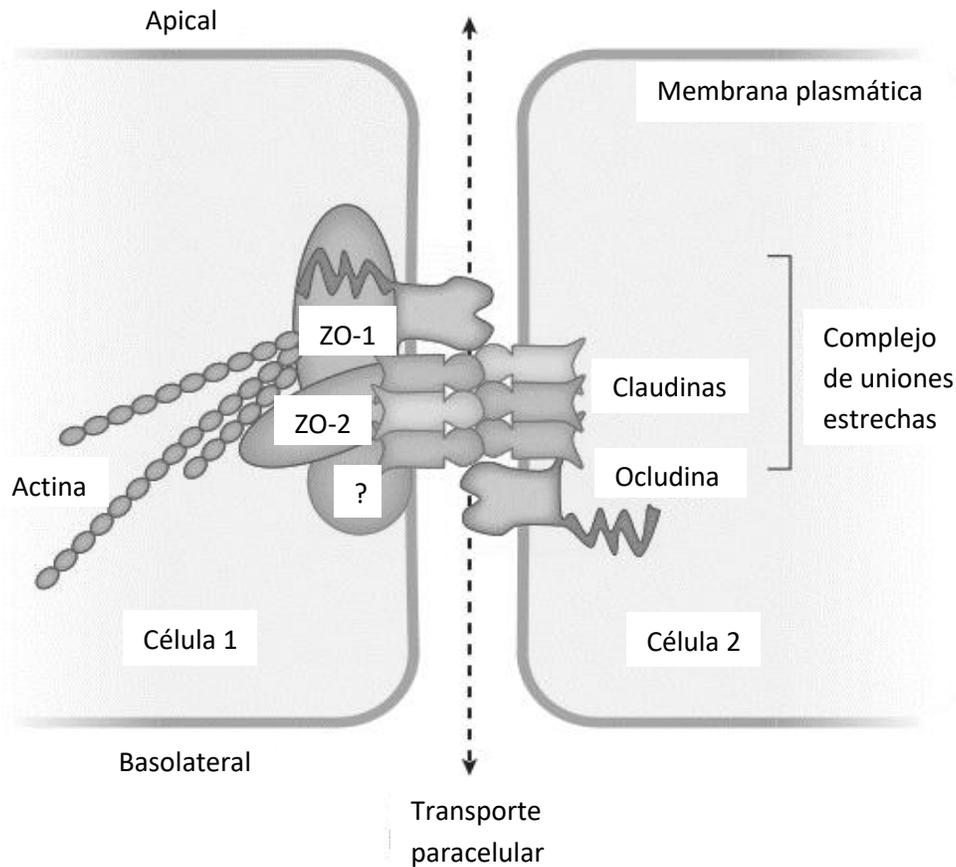


Figura 5. Complejo de proteínas de uniones estrechas. Los principales componentes son las proteínas transmembranales (claudinas, ocludina), proteínas de andamiaje (ZO-1, ZO-2) y el citoesqueleto de actina. Las proteínas adicionales de andamiaje se representan por (?). Las interacciones cabeza a cabeza entre claudinas en células adyacentes forman los poros que restringen la permeabilidad. Existen interacciones homotípicas (entre el mismo tipo de claudina) y heterotípicas (entre diferentes tipos de claudinas).

Las TJs están involucradas en la transformación de la membrana plasmática, que es una serie de cambios que implican la reorganización de la membrana plasmática y del citoesqueleto de las células epiteliales del útero. Estos cambios están regulados por hormonas con el fin de hacer al epitelio uterino receptivo a la adhesión de las células del blastocisto (Murphy et al.,

2000). La adecuada transformación de la membrana plasmática influye en la implantación exitosa del blastocisto.

Estudios de crío-fractura del epitelio uterino de rata, mostraron que las TJs están bajo la influencia de hormonas ováricas (progesterona y estrógenos). Murphy et al. (1982) sugiere que estas hormonas controlan el aumento en la profundidad y complejidad de las redes de las TJs en el momento de la implantación para prevenir o reducir la difusión de moléculas por vía paracelular. La estimulación con estrógenos provoca una red de TJs con filamentos paralelos, mientras que la estimulación con progesterona hace que la red de TJs se extienda a mayor profundidad en la membrana lateral y los filamentos estén más interconectados, que es como se observa en el momento de la implantación.

En estudios *in vitro*, se ha observado que la ocludina interactúa con otras proteínas de uniones estrechas, como ZO-1, ZO-2 y ZO-3, que unen a la ocludina con el citoesqueleto de actina. La ocludina confiere adhesividad a las uniones estrechas (Van Itallie et al., 1997), mientras que las claudinas contribuyen tanto con la adhesión como con la función de barrera y poro selectivo de las TJs (Kubota et al., 1999).

En el blastocisto, el primer epitelio que se forma durante el desarrollo temprano es el epitelio del trofotodermo (ET) que cubre la superficie del blastocisto y encierra la masa celular interna. La permeabilidad entre células del ET y la unión célula-célula son reguladas por las TJs. Si la barrera formada por las TJs es insuficiente, los materiales transportados podrían escapar fácilmente por el espacio paracelular y la expansión de la cavidad del blastocisto nunca ocurriría (Schneeberger et al., 2004; Tsukita et al., 2001) lo que llevaría a un desarrollo anormal.

3.6. Claudinas.

Las claudinas son proteínas con un peso molecular de 22-27 kDa que contienen 4 dominios transmembranales, 2 loops extracelulares y los extremos amino y carboxilo se encuentran localizados en el citoplasma (Fig. 6). Las claudinas contienen motivos conservados de

palmitoilación, que promueven la inserción de las claudinas en zonas enriquecidas con colesterol de la membrana citoplasmática y el ensamblaje de las TJs (Van Itallie et al., 2005).

El primer loop extracelular (EL1) contiene alrededor de 50 aminoácidos y es responsable de la permeabilidad selectiva de las TJs. El segundo loop extracelular (EL2) es más pequeño, contiene alrededor de 16 aminoácidos e interacciona con otras claudinas permitiendo la adhesión célula-célula.

La expresión de las claudinas varía dependiendo del tipo de epitelio, de los requerimientos fisiológicos, cambios sobre el transcurso del desarrollo (Reyes et al., 2002) y es alterado por un gran número de enfermedades.

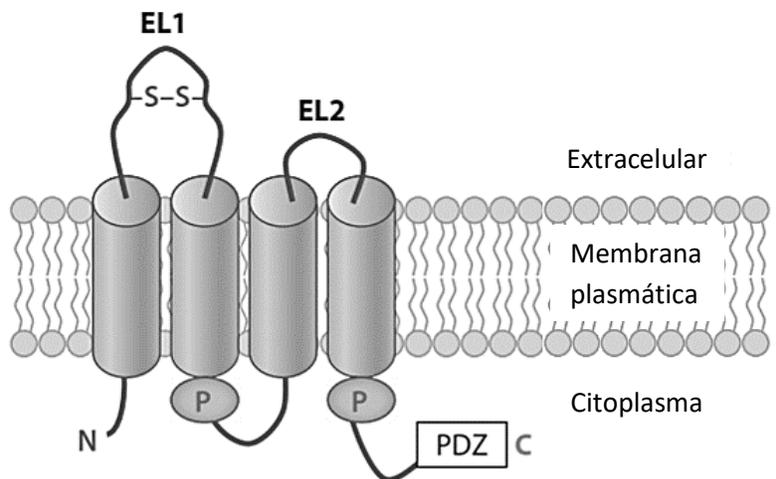


Figura 6. Estructura de las claudinas. Se observa que posee 4 dominios transmembranales, los extremos amino y carboxilo se encuentran en el citoplasma, tiene dos loops extracelulares, el EL1 contiene un enlace disulfuro (S-S) que le da estabilidad. También posee dos motivos de palmitoilación y un motivo de unión a PDZ en el extremo C-Terminal.

Las claudinas se asocian por interacciones *cis* dentro de la membrana plasmática de la misma célula en dímeros, e interacciones *trans* entre claudinas en células adyacentes. Además de formar una barrera, las claudinas pueden aumentar la permeabilidad paracelular selectiva de cationes y aniones. Las claudinas con un EC1 con más cargas negativas (claudinas-2, -10a, -15) son más selectivas para cationes, mientras que las que tienen con un EC1 con más cargas positivas (claudinas-10b, -17) son selectivas para aniones.

3.6.1. Claudina-3.

La claudina 3 es expresada en una variedad de epitelios, tales como el respiratorio, urinario y el tracto gastrointestinal, y en glándulas salivales y mamarias. Diversos estudios indican que la claudina-3 actúa como una proteína formadora de la barrera de las TJ (Günzel et al., 2013).

En experimentos en los cuales se expresó establemente la claudina-3 en fibroblastos NIH/3T3, se observó una reducción en la permeabilidad paracelular para moléculas muy grandes (dextran 2000 kDa) y el desarrollo de una pequeña resistencia a través de la capa de células de fibroblastos (Coyne et al., 2003).

Así mismo, la sobre-expresión de claudina-3 en células de riñón MDCK II indujo un incremento en la resistencia paracelular (Milatz et al., 2010). En cambio, una disminución de la expresión de la claudina-3 en diferentes tipos celulares causa un decremento en la función de la barrera (Hashimoto et al., 2008; McLaughlin et al., 2004; Reiter et al., 2006).

En las células de Sertoli del testículo de ratón la claudina-3 se expresa temporalmente durante la pubertad, cuando se desarrolla la barrera hemato-testicular, según se evaluó por el decremento de la permeabilidad a la biotina. En ratones en los que se ha deletado el receptor de andrógenos, las células de Sertoli no expresan la claudina-3 y la biotina permanece constantemente alta (Meng et al., 2005).

Claudina-3 también es un componente de la barrera hematoencefálica y su pérdida selectiva de las TJs causa una pérdida de la función de barrera del epitelio, dando lugar a enfermedades como encefalomiелitis autoinmune y tumores de glioblastoma (Wolburg et al., 2003).

En contraste, existen informes de células epiteliales alveolares, en las que la claudina-3 parece estar muy expresada en condiciones de disminución de la función de la barrera (Chen et al., 2005). Cuando se sobreexpresó en las células epiteliales alveolares, se encontró que la resistencia transepitelial disminuyó y se incrementó el flujo de sustancias marcadoras vía paracelular (600 Da calceína; 10 kDa dextran) (Mitchell et al., 2011).

3.6.2. Claudina-4.

La claudina-4 es expresada abundantemente en el riñón, principalmente en los conductos colectores, y en el pulmón. En estudios *in vitro*, dependiendo del tipo de célula que se está investigando, actúa como barrera general (Michikawa et al., 2008), como una barrera de Na⁺ sin afectar la permeabilidad de Cl⁻ (Van Itallie et al., 2001) o, al interactuar con la claudina-8, como un poro de Cl⁻/aniones (Hou et al., 2010).

En el riñón, se ha postulado que la claudina-4 permite la permeabilidad pasiva de Cl⁻ en los túbulos colectores y de este modo facilita la reabsorción de NaCl impulsada por el transporte electrogénico de Na⁺ a través del canal epitelial de Na⁺ (ENaC) (Hou et al., 2010).

En el pulmón, se ha sugerido que la claudina-4 mantiene una barrera alveolar estrecha de Na⁺ y así, evita la fuga de fluido y electrolitos en el espacio alveolar. Esta idea coincide con un estudio realizado en ratones a los que se les administró un péptido C-terminal de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) que elimina la claudina-4 (pero también la claudina 3) de las TJs, lo cual inhibió la depuración del líquido en el espacio aéreo y exacerbó el edema pulmonar (Wray et al., 2009).

En el colon, se ha reportado que la claudina-4 actúa haciendo más impermeable el transporte paracelular, ya que en varias condiciones en las que se incrementa la permeabilidad se ha observado un decremento la expresión de la claudina-4 (Günzel et al., 2012).

3.6.3. Claudina-7.

La claudina-7 es expresada en diversos tejidos epiteliales, de los cuáles el pulmón y el riñón tienen los niveles más altos (Alexandre et al., 2005, Li et al., 2004).

El estudio *in vitro* de su función ha llevado a conclusiones opuestas. La sobreexpresión de claudina 7 en células de epitelio de riñón porcino, LLC-PK, causó la disminución en la permeabilidad al Cl⁻ y un ligero aumento simultáneo de la permeabilidad al Na⁺, lo que sugirió

que es una claudina selectiva de cationes (Alexandre et al., 2007). Por otro lado, Hou et al., (2006) encontró en células MDCK de riñón y LLC-PK en la cuales se había deletado el gen de claudina-7, un aumento en la permeabilidad al Na⁺ y una disminución en la permeabilidad de Cl⁻, respectivamente, lo que sugirió una conclusión contraria: la claudina-7 es selectiva a aniones.

La claudina-7 se diferencia de los otros miembros de la familia de las claudinas en que su localización no se restringe a las uniones estrechas epiteliales (Gonzalez-Mariscal et al., 2006; Inai et al., 2007; Mendoza-Rodríguez et al., 2005). Esta proteína demuestra una localización diferente en la membrana basolateral en epitelios normales, como el intestino murino y la nefrona y epidídimo de ratas (Ding et al., 2012; Gonzalez-Mariscal et al., 2006). Así mismo, se ha demostrado que puede formar complejos con moléculas de adhesión celular epitelial (EpCAM) (Nubel et al., 2009), así como complejos con la claudina-1 y la integrina $\alpha 2$ (Ding et al., 2012). La formación de complejos con la integrina $\alpha 2$ promueve la adhesión entre la célula y la matriz extracelular, ya que la claudina-7 estabiliza a la integrina $\alpha 2$, la cual es responsable de adherirse a los componentes de la matriz extracelular (Ding et al., 2012).

3.6.4 Expresión de claudinas en el epitelio uterino.

En el epitelio uterino se han detectado 5 claudinas: claudina-1, -3, -4, -5 y -7 durante el ciclo estral y la gestación temprana. Dos de estas proteínas, claudina-3 y -4, se localizan específicamente en las TJs y claudina-4, en particular, presenta una regulación a la alta durante la ventana de implantación (Mendoza-Rodríguez et al., 2005; Nicholson et al., 2010; Wang et al., 2004).

Las claudinas-1, -3, -5 y -7, la ocludina y ZO-1 han sido estudiadas en el epitelio uterino de rata durante el ciclo estral en nuestro laboratorio (Mendoza-Rodríguez et al., 2005). Estas proteínas son más abundantes en las TJs durante el proestro y estro cuando hay picos de estradiol y progesterona.

Durante la implantación del blastocisto, la ocludina, claudina-3 y claudina-4 se encuentran localizadas en la región de TJs de las células epiteliales uterinas (CEU) (Nicholson et al., 2010). La expresión de ocludina y claudina-4 es influenciada por la progesterona, que domina el útero durante el tiempo de receptividad uterina (Pollard et al., 1972).

En el útero, se ha reportado que la claudina-4 disminuye el transporte paracelular de solutos porque promueve las adhesiones en las TJs, las cuales contribuyen en la regulación del contenido del fluido luminal promoviendo la implantación del blastocisto (Nicholson et al., 2010; Wang et al., 2004). También se ha demostrado que disminuye la conductancia paracelular e incrementa la complejidad de las redes de TJs (Van Itallie et al., 2001).

En el día 1 de gestación, la claudina-3 se observa en la parte apical de la membrana lateral y en la parte basal de la membrana citoplasmática en las células del epitelio luminal y del epitelio glandular. La expresión de claudina-4 es casi indetectable en este día (Nicholson et al., 2010).

En el día 6 se observa que la claudina-3 se expresa en la parte basal y lateral de la membrana citoplasmática de las células del epitelio luminal. Se ha observado un aumento de claudina-4 en la región de la TJ en el epitelio luminal durante la ventana de implantación (Nicholson et al., 2010).

Durante el día 1 de gestación, la claudina-7 se presenta en la pared basal y lateral del epitelio uterino luminal. Con el transcurso de la gestación su expresión va disminuyendo hasta que en el día 7 apenas es detectable en el epitelio uterino. La disminución de los niveles de claudina-7 se debe a factores maternos independientes de la presencia del blastocisto (Poon et al., 2013).

3.7. Enfermedades relacionadas con las claudinas.

Estudios recientes han demostrado que enfermedades severas están asociadas con la alteración de claudinas (Günzel et al., 2012).

La claudina-2 constituye un canal paracelular selectivo y permeable a Na^+ dentro de las TJs de los túbulos proximales del ratón. Una variante de esta claudina, se asocia con un riesgo mayor de padecer la enfermedad de Crohn (Söderman et al., 2013). La claudina-3 y -4, controlan el crecimiento tumoral y las metástasis mediante el mantenimiento de la expresión de E-cadherina y la limitación de la señalización de β -catenina (Shang et al., 2012). Personas con mutaciones en claudina-19 tienen un alto riesgo de progresión de enfermedad renal crónica (Claverie-Martin et al., 2013).

La claudina-16 y -19 forman un canal catiónico permeable a Ca^{2+} y Mg^{2+} , y generan un voltaje positivo en el lumen debido al gradiente transepitelial de sales que impulsan la reabsorción de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Hou et al., 2008). Estas proteínas se localizan exclusivamente en el asa ascendente de Henle en el riñón (Hou et al., 2009). Las mutaciones en estos dos genes de claudinas ocasionan un desorden renal autosómico recesivo con presencia de hipomagnesemia, hipercalciuria y nefrocalcinosis (Konrad et al., 2006; Simon et al., 1999). Un estudio reciente asociado al genoma, identificó que la mutación del gen de claudina-14 tiene un riesgo importante para desarrollar nefrolitiasis hipercalciúrica (Thorleifsson et al., 2009).

Un estudio encontró que las claudinas-3 y -4 son altamente expresadas en cáncer de ovario (Hough et al., 2000). En adición, un número de claudinas (incluyendo claudinas-1, -3, -4, -7, -10, -16, -18) se han encontrado alteradas en diferentes tipos de cáncer humano (Morin 2005).

Se han generado varios modelos de ratones knockout de claudina, y la diversidad de fenotipos obtenidos demuestran su papel importante en el mantenimiento de la integridad de los tejidos en diversos órganos. La eliminación de claudina-1 en los ratones conduce a la pérdida de la barrera de las TJs, perdiendo agua y macromoléculas en el estrato granuloso de la epidermis,

como consecuencia, estos ratones mueren de deshidratación en el período neonatal (Furuse et al., 2002).

La maduración de la barrera intestinal de los roedores se debe a la expresión de claudina-3 que es inducida por la administración de bacterias probióticas (Patel et al., 2012). Ratones knockout de claudina-3 en células de adenocarcinoma gástrico humano (MKN28), aumenta la permeabilidad paracelular (Hashimoto et al., 2008), Ratones sin claudina-3 tienen una barrera hematoencefálica dañada, lo que los lleva a tener un inicio más rápido de signos clínicos de encefalomiелitis autoinmune experimental (Kooij et al., 2014).

Los ratones knockout de claudina-4 desarrollan defectos urológicos y renales, que incluyen pérdida urinaria de Ca^{2+} y Cl^- , hidronefrosis, obstrucción del tracto urinario e hiperplasia urotelial (Fujita et al., 2012). Ratones knockout de claudina-4 y -8 tienen una disminución significativa en la permeabilidad paracelular de Cl^- sin afectar la permeabilidad de Na^+ (Hou et al., 2010). Por otra parte, los ratones knockout desarrollan hipocalcemia debido al incremento de excreción urinaria de K^+ (Gong et al., 2015).

Ratones knockout de claudina-5 padecen de extravasación de moléculas con un peso molecular inferior a 0.8 kDa en el cerebro y parénquima de la médula espinal, mientras que en los ratones del grupo control estas moléculas están restringidas al compartimiento intravascular (Nitta et al., 2003).

En ratones knockout de claudina-7 las TJs perdieron la función de barrera para el Na^+ y Cl^- , lo que llevó a los ratones a desarrollar pérdida renal severa de Na^+ , K^+ , Cl^- y agua, y murieron 12 días después del nacimiento (Tatum et al., 2010).

3.8. Efecto del BPA sobre la expresión de las proteínas de las TJ en el útero.

Un estudio reciente realizado por Martínez-Peña et al., 2017, encontró que la exposición perinatal al BPA, a dosis baja: 0.05 mg/kg/día (grupo BPA-L) y a dosis alta: 20 mg/kg/día (grupo BPA-H), ejercen cambios en la expresión de proteínas de uniones estrechas (TJ) durante la gestación temprana.

Durante el día 1 de gestación (D1), ZO-1 disminuyó su expresión en el grupo BPA-L, mientras que el grupo BPA-H presentó una intensidad de señal intermedia y una distribución puntual. También se encontró que la expresión de claudina-1 aumentó con la cantidad de BPA administrado, en comparación con el grupo control.

En el día 3 de gestación (D3), el grupo BPA-L expresó una cantidad de ZO-1 casi indetectable, a diferencia del grupo BPA-H que presentó una señal evidente localizada en la porción apical de la membrana plasmática. La expresión de claudina-1 fue mayor en el grupo BPA-H comparado con el grupo BPA-L, esta proteína fue localizada en la membrana lateral en ambos grupos.

Durante el día 6 de gestación en el sitio de implantación, en el grupo BPA-L ZO-1 fue más expresada en la membrana lateral comparado con el grupo control, mientras que en el grupo BPA-H, ZO-1 se concentró en la parte apical de la membrana lateral. En el sitio de no implantación, ZO-1 se expresa en la parte apical de la membrana lateral en el grupo control y los grupos tratados con BPA presentan la misma intensidad de tinción. En el sitio de implantación del D6, el tratamiento con BPA aumenta de forma dependiente a la dosis la expresión de claudina-1 en la membrana lateral y en el citoplasma. En el sitio de no implantación, la expresión de claudina-1 en la membrana lateral y citoplasma fue mayor en el grupo BPA-L que la de los grupos control y BPA-H.

Por último, en el día 7 de gestación, en el sitio de implantación, la expresión de ZO-1 pasó de una distribución puntual en el grupo control y BPA-H a una distribución en la parte apical de la

membrana lateral en el grupo BPA-L. En el sitio de no implantación, la menor expresión de ZO-1 la detectaron, en la parte superior de la membrana lateral, en el grupo control, una tinción intermedia en el grupo BPA-H y una mayor tinción en el grupo BPA-L. El tratamiento con BPA cambió la expresión de la claudina-1. En el sitio de implantación la dosis baja provocó una tinción citoplasmática difusa, mientras que la dosis alta provocó un aumento de la señal basolateral detectada en el grupo control. En el sitio de no implantación, se observó un aumento de claudina-1, en la membrana lateral, en los grupos tratados con BPA respecto al grupo control.

Todos estos resultados nos indican que ambas dosis de BPA administradas durante el periodo perinatal producen cambios importantes en la expresión de proteínas de las TJ estudiadas en el momento que los animales llegan a la etapa adulta y quedan gestantes. Estos cambios en la expresión de las proteínas de las TJ podrían explicar la disminución de los sitios de implantación detectados en estos animales. Es por ello que es importante estudiar cómo cambia la expresión y localización de otras proteínas de las TJ para tener un panorama más completo de lo que sucede en estos animales durante la gestación y poder explicar la disminución de los sitios de implantación previamente observados.

4. Planteamiento del problema.

En la actualidad la tasa de infertilidad ha aumentado de forma considerable comparado con décadas anteriores, lo que ha llevado a que se realicen una gran cantidad de estudios para tratar de explicar este hecho biológico. Las investigaciones señalan a los disruptores endócrinos como agentes involucrados en la disminución de la fertilidad humana, debido a que estos compuestos, exógenos al organismo, tienen una acción mimética a las hormonas naturales (estradiol y progesterona), por lo que pueden alterar la homeostasis del sistema endócrino y reproductivo. Así mismo las exposiciones a compuestos que interfieren con la reorganización y transformación del endometrio uterino para la implantación del blastocisto y el embarazo exitoso afectan de forma adversa la fertilidad.

El BPA es un disruptor endócrino al cual estamos expuestos en la vida cotidiana debido a su uso en la elaboración de empaques de alimentos que consumimos, por lo cual es muy importante estudiar sus efectos sobre el organismo. Existen estudios que demuestran los efectos dañinos que ejerce la ingesta de este compuesto, tanto en el desarrollo como en la etapa adulta, sobre la salud reproductiva.

Se ha encontrado que el BPA ejerce cambios en la receptividad del endometrio a blastocistos durante la implantación; además de que puede alterar el desarrollo del blastocisto antes de la implantación, lo que lleva a la pérdida de la capacidad de invasión del blastocisto en el endometrio.

En nuestro laboratorio hemos estudiado el efecto de la administración perinatal de una dosis baja (0.05 mg/kg/día) y una dosis alta (20 mg/kg/día) de BPA en ratas Wistar en el número de sitios de implantación y se observó que la dosis alta de BPA ocasionó una disminución significativa en el número de sitios de implantación con respecto al grupo control.

Además de esto, hemos estudiado la expresión de las claudinas-1, -3, -5 y -5, la ocludina y ZO-1 en el epitelio uterino de rata durante el ciclo estral y se observó que son más abundantes en las TJs durante el proestro y estro cuando hay picos de estrógeno y progesterona. Y

posteriormente se realizó un estudio para evaluar el efecto del BPA a una dosis baja 0.05 mg/kg/día y una dosis alta 20 mg/kg/día sobre la expresión de ZO-1 y claudina-1 en los días 1, 3, 6 y 7 de gestación observando cambios en la intensidad de la tinción y localización celular de las proteínas.

Sin embargo, todavía no se establece de forma precisa el mecanismo de acción del BPA, por lo que el presente proyecto se enfoca en la posible alteración en la expresión de tres proteínas de las TJ por el BPA: claudina-3, -4 y -7 en el epitelio uterino, las cuales están involucradas en el proceso de implantación del blastocisto.

5. Hipótesis.

Debido a los efectos conocidos del disruptor endócrino bisfenol-A sobre el sistema endócrino y reproductor, se espera observar alteraciones en la expresión de las proteínas de uniones estrechas claudina-3, -4 y -7 en células del epitelio uterino, en ratas adultas preñadas que fueron tratadas de forma perinatal con el bisfenol-A.

6. Objetivo General.

Evaluar el efecto que tiene distintas dosis del disruptor endócrino bisfenol-A sobre la expresión de proteínas de uniones estrechas (claudina-3, -4 y -7) en epitelio uterino durante la gestación temprana (días 1, 3, 6 y 7) de crías de ratas Wistar cuando se le ha administrado el compuesto a la madre durante la gestación y la lactancia.

7. Metodología.

7.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron animales del Bioterio Harlan México bajo estrictos controles de periodos luz:oscuridad 12h:12h, con agua y comida ad libitum. Este estudio fue aprobado por el comité de ética (CICUAL) de la Facultad de Química. Se determinó diariamente la etapa del ciclo de 48 hembras Wistar con el fin de obtener a 21 hembras aptas para el experimento. Una vez seleccionadas, se utilizaron 15 machos, también Wistar, para las montas.

7.2. Monitoreo del ciclo estral y apareamiento.

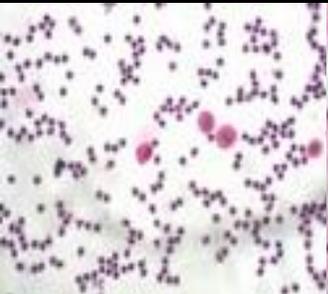
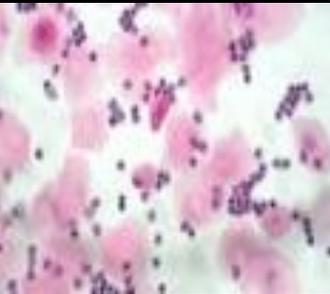
Para el monitoreo del ciclo estral de las 48 ratas iniciales, se tomó con un asa bacteriológica, esterilizada al rojo vivo y enfriada en agua, un frotis vaginal y se procedió a tomar una gota de agua con el asa y la muestra para facilitar su colocación en un portaobjetos marcado. Se repitió la operación con todas las ratas monitoreadas de manera cotidiana durante al menos dos ciclos regulares antes de ser apareadas.

La tinción de los frotis se realizó aplicando hematoxilina directamente sobre el portaobjetos y removiendo el colorante tras cinco minutos. Posteriormente, se enjuagó el portaobjetos con agua destilada y se colocó dentro de una solución saturada de carbonato de litio durante treinta segundos. Transcurridos los treinta segundos, se enjuagó nuevamente el portaobjetos con agua destilada y se dejó secar. Una vez seco el portaobjetos, se procedió a aplicarle eosina durante diez minutos y finalmente a enjuagarlo con etanol al 70%. En cuanto el portaobjetos secaba, estaba listo para analizarse al microscopio.

De acuerdo con el tipo de células predominante en el frotis, se pudo definir la etapa en la que se encontraba la rata. El ciclo estral de la rata dura entre cuatro y cinco días y consta de cuatro etapas, es decir, aproximadamente una por día. En la Tabla 1 se puede observar el tipo de células que predomina en cada etapa.

Después de seleccionar a las 21 ratas con ciclos regulares, se procedió a controlar su apareamiento. Con base en el monitoreo, se observó el día en el que la hembra era receptiva al macho (tarde del proestro) y se colocó a este último en la jaula de la hembra a las seis de la tarde y se removió a las once de la mañana del día siguiente. Inmediatamente después de remover al macho, se le tomó frotis vaginal a la hembra con el fin de verificar el apareamiento. El frotis teñido de la hembra preñada debería mostrar espermatozoides el día posterior a la monta para que este día fuera considerado como el día 1 de gestación.

Tabla 1. Descripción de las células predominantes en las cuatro etapas del ciclo estral de la rata.

Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
			
<p>Se observan células redondeadas, con un núcleo bien definido y agrupadas en racimo, que se tiñen de azul.</p>	<p>Se observan células de descamación que se asemejan a hojuelas con bordes irregulares y sin núcleo que se tiñen de rosa intenso. El frotis suele ser abundante.</p>	<p>Predominan los leucocitos, que se observan azules y mucho más pequeños que el resto de las células.</p>	<p>No se observa un claro predominio de un cierto tipo de célula. Se observan células nucleadas, descamadas y leucocitos en proporciones similares. El frotis suele ser escaso.</p>

7.3. Tratamiento farmacológico de la generación F0.

Una vez verificada la gestación de la rata, se pesó y se clasificó en alguno de los tres grupos, ya sea control, grupo BPA-L: dosis baja de BPA (0.05 mg/kg/día) o grupo BPA-H: dosis alta (20 mg/kg/día). De acuerdo con las estimaciones de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) la dosis menor de efectos adversos observada (LOAEL) para la

exposición oral a BPA en ratas es 50 mg/kg/día. Expertos del Programa Nacional Toxicológico (NTP) sugirieron una dosis de corte de 5 mg BPA/kg/día para la clasificación de efectos a dosis bajas, sin importar la vía de administración, duración de la exposición o la etapa/edad de la vida en la cual ocurre esta exposición (Melnick *et al.*, 2002). Por lo tanto, la dosis alta seleccionada en el presente proyecto es cuatro veces mayor a la dosis de corte baja sugerida por los expertos de la NTP y 2.5 veces menor que el LOAEL de U.S. EPA. La dosis baja es 100 veces menor a la dosis de corte baja sugerida por los expertos de la NTP y corresponde a la ingesta diaria admisible (IDA) de BPA.

Con las ratas que recibieron directamente el compuesto, se monitoreó el volumen de agua ingerido diariamente antes del tratamiento, obteniendo un promedio de 30 mL. Se consideró este volumen así como el peso individual de cada rata en la preparación del agua de bebida de cada uno de los grupos tratados.

Se pesó en balanza analítica la cantidad indicada de BPA y se disolvió en etanol absoluto utilizando un tubo eppendorf y un vortex. Esta disolución se agregó al agua de bebida de los animales de tal forma que el etanol quedara a una concentración final del 0.1%. Esta agua se suministró en botella de vidrio para evitar que compuestos provenientes de botellas de plástico que contengan policarbonato interfieran en los resultados. Se decidió suministrar de esta forma el compuesto ya que por medio de la ingesta es la principal forma de exposición de los humanos a este compuesto. De esta forma, el grupo control solamente ingirió agua destilada con etanol al 0.1%. Las hembras preñadas recibieron el tratamiento a partir del día 6 de gestación y hasta el día postnatal 21. Se verificó el volumen ingerido diariamente de agua de bebida durante el tratamiento con el fin de asegurar que las ratas recibían la dosis correspondiente al grupo en el cual fueron clasificadas. Nuevamente, se obtuvo un promedio de 30 mL de agua consumidos diario con una ligera tendencia a aumentar durante la gestación.

7.4. Obtención de la generación F1.

Las hembras F0 tratadas se dejaron llegar al término de la gestación. El día del parto se registró el número de crías y se ajustaron a 10 crías por madre. Se dejaron con la madre hasta el día

del destete, es decir, el día postnatal 21. Ese día, se sexaron las crías y se separaron machos de hembras. A las crías hembras F1 se les marcó y se les colocó agua libre de BPA y comida ad libitum. Se les dejó crecer 3 meses y se les determinó, por frotis vaginal, como ya se ha explicado, el día del ciclo estral. Se aparearon estas hembras F1 con machos Wistar control que no tuvieron ningún tratamiento de la misma forma como se ha explicado con anterioridad. El apareamiento se verificó por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal del día siguiente. Las hembras gestantes se sacrificaron en los días 1, 3, 6 y 7 de la gestación.

7.5. Procesamiento de los tejidos.

De las hembras sacrificadas a los días 1, 3, 6 y 7 de gestación se obtuvo una muestra de aproximadamente 5 mm del útero. En las hembras sacrificadas a los días 6 y 7 de gestación, se obtuvo una muestra tanto de sitios de implantación, como de sitios de no implantación. Para detectar los sitios de implantación, media hora antes del sacrificio se inyectó por vía intravenosa 350 μ L de una solución de azul de Evans al 0.5%. Los sitios de implantación se tiñen de color azul debido al aumento de la vascularización. Las muestras fueron fijadas con una solución al 4 % de paraformaldehído en PBS (NaCl 0.137 M, KCl 0.00268 M, Na₂HPO₄ 0.01014 M, KH₂PO₄ 0.00176 M; pH 7.4) durante 2 horas y posteriormente se lavaron con una solución de PBS en la que permanecieron hasta su posterior tratamiento.

Tras obtener el tejido uterino, se procesaron las muestras en un histoquinete Microm de manera que fueron sumergidas durante 15 minutos en disoluciones de concentraciones crecientes de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100 % v/v) y posteriormente 1 hora en dos recipientes de xilol, para finalmente ser parafinadas durante 2 horas. Una vez que los tejidos fueron deshidratados y parafinados en el procesador de tejidos, se incluyeron las muestras en bloques de parafina de manera que cada bloque contenía las muestras de las 5 ratas de cada tratamiento para cada día de gestación, separando sitios de implantación y de no implantación en el caso de los días 6 y 7. Así, se obtuvieron 18 bloques en total.

Obtenidos los bloques, se procedió a cortarlos con un microtomo Leica modelo RM2145 y transferir los cortes de 5 μ m a portaobjetos previamente tratados con poli-L lisina. Para este tratamiento, los portaobjetos fueron limpiados con una gasa impregnada con etanol absoluto y

sumergidos durante treinta minutos en una solución de poli-L lisina (50 µg de poli-L lisina/mL de tris-HCl 10 mM, pH 8.0) para posteriormente ser secados y repetir la operación otras dos veces.

7.6. Estudio de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas.

Para evaluar la expresión de las proteínas se realizaron ensayos de inmunohistoquímica de fluorescencia. Las muestras de tejido se desparafinaron a 60°C durante 30 minutos y se rehidrataron tratándolos por 5 minutos con disoluciones consecutivas de xilol al 100%, xilol:etanol 50:50 v/v, etanol al 100%, 96%, 90%, 80%, 70% y 50% y por último agua destilada. Posteriormente, se colocaron en una solución de citrato de sodio 10 mM a pH 6 previamente hervida y se calentaron durante 10 minutos en horno de microondas. Se repitió este último paso una vez más. Tras dejar enfriar, se lavaron los tejidos por 5 minutos con PBS dos veces y se permeabilizaron en Tritón X-100 al 0.5% en PBS. Nuevamente se les dieron dos lavados de 5 minutos con PBS y se les trató por media hora con albúmina al 5% en PBS para bloquear uniones inespecíficas. Transcurrida la media hora, se agregó el anticuerpo primario (dilución 1:200): anticuerpo de conejo anti-claudina-3, anticuerpo de ratón anti-claudina-4 o anticuerpo de conejo anti-claudina-7 (34-1700, 32-9400, 34-9100, Invitrogen) en Tritón x-100 al 3% en PBS y se dejó incubar en refrigeración toda la noche. Al día siguiente, se les dieron a los tejidos otros dos lavados de 5 minutos con PBS y se agregó el anticuerpo secundario de burro anti-IgGs de conejo conjugado con rodamina-(TRITC) (711-025-152 de Jackson Immuno Research Laboratories Inc) o el anticuerpo secundario de cabra anti-IgGs de ratón conjugado con Alexa-Fluor 488 (A11001 Invitrogen, USA), a 1.5 mg/mL en una dilución de 1:100 con PBS y se dejó incubar durante 2 horas teniendo cuidado de no exponer los portaobjetos a la luz para preservar la señal del fluoróforo. Por último, se realizaron otros dos lavados de 5 minutos con PBS y se montaron las muestras agregando medio de montaje para fluorescencia adicionado con DAPI para teñir los núcleos celulares y sellando con barniz. Para los controles negativos, se omitió el anticuerpo primario. La fluorescencia se examinó y se capturó la imagen con un microscopio confocal (Olympus FV1000).

8. Resultados.

Se analizó la expresión y distribución de claudinas-3, -4 y -7 porque estas proteínas son expresadas en las TJ de una gran variedad de tejidos, y su nivel de expresión se ve modificado en respuesta a varios procesos tanto patológicos como fisiológicos, por ejemplo el ciclo estral y el embarazo, en especial, en la transformación de la membrana plasmática del útero para volverse receptivo después de la fecundación del óvulo durante la gestación temprana.

Se observó que el tratamiento perinatal de BPA provocó cambios en:

- En el nivel de expresión y distribución de TJ en el útero de las ratas F1 preñadas.
- La expresión de TJ en células estromales del útero durante la penetración del blastocisto.
- La expresión de TJ en el epitelio uterino, que varió entre el sitio de implantación (SI) y el sitio de no implantación (SNI) durante el embarazo temprano.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la expresión de claudinas-3, -4 y -7, durante los días 1, 3, 6 y 7 de embarazo.

8.1. Expresión de las claudinas en el útero de ratas control durante los diferentes días de la gestación.

En el grupo de ratas control se observó que la expresión de las claudinas estudiadas varía con el tiempo durante la gestación (Figura 7). De esta manera, la claudina-3 mostró un pico de expresión en el día 3 (Fig. 7B) mientras que claudina-4 se expresa a partir del día 6 en el sitio de implantación (Fig. 7I). También se encontró que la expresión de la claudina-7 en el día 6 y 7 (Fig. 7O y Q) es menor que en los días 1 y 3 (Fig. 7M y N), pero en los días 6 y 7 se expresa más en los sitios de no implantación (Fig. 7P y R) que en los sitios de implantación (Fig. 7O y Q).

Control

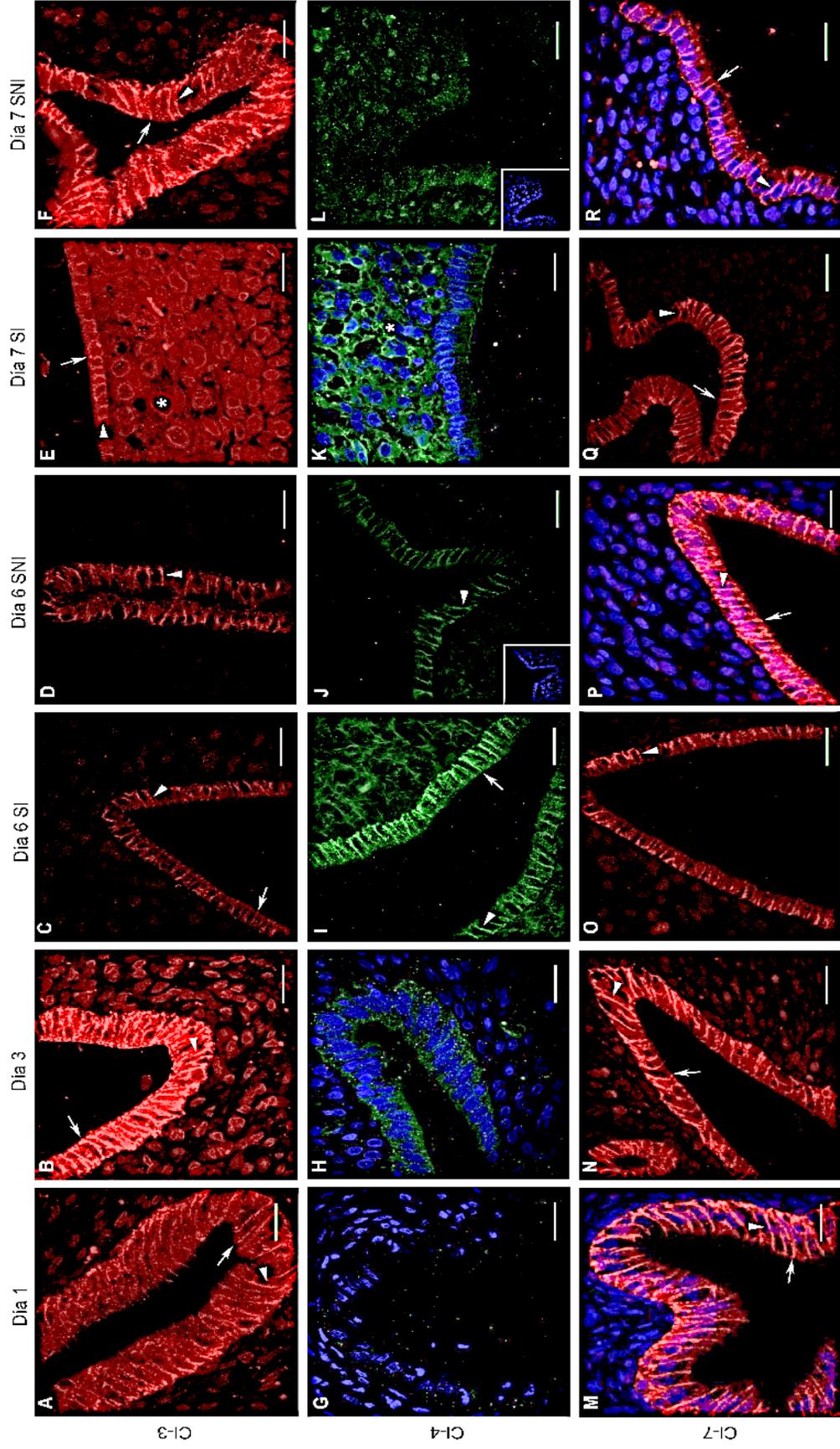


Figura 7. Inmunofluorescencia para detectar la expresión y la localización de las claudinas-3, -4 y -7 en células del epitelio uterino de animales control durante los días 1, 3, 6 y 7 de la gestación, tanto en sitios de implantación (SI) como en sitios de no implantación (SNI). Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral en las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 µm. n= 5 animales por día de gestación. La tinción de los núcleos se realizó con DAPI por lo que se ven en azul. En los cuadros A-F, I, N, O y Q no se utilizó DAPI para observar mejor la tinción de la claudina correspondiente.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos de la expresión y localización de claudinas en útero de ratas tratadas con BPA durante la gestación temprana.

	Control	BPA-L	BPA-H
D1			
Claudina-3	+ membrana lateral	+ membrana lateral	+/- membrana basal
Claudina-4	--	+ membrana basolateral	--
Claudina-7	+++ membrana basolateral	+ mitad inferior de la membrana lateral	+++ membrana basolateral
D3			
Claudina-3	+++ membrana lateral	+ membrana lateral	++ membrana lateral
Claudina-4	--	+ membrana basolateral	+ membrana basolateral
Claudina-7	+++ membrana basolateral	+ mitad inferior de la membrana lateral	+++ membrana basolateral
D6 SI			
Claudina-3	+ membrana lateral	+ membrana lateral / + estroma	+ membrana lateral
Claudina-4	+ membrana basolateral	++ membrana basolateral / + estroma	+/- parte superior de la membrana lateral
Claudina-7	++ mitad inferior de la membrana lateral	+ membrana basolateral	+ mitad inferior de la membrana lateral
D6 SNI			
Claudina-3	++ membrana lateral	++ membrana lateral / + estroma	++ membrana lateral
Claudina-4	+ mitad inferior de la membrana lateral	--	+ mitad inferior de la membrana lateral
Claudina-7	+++ membrana basolateral	++ membrana basolateral	+ membrana basolateral
D7 SI			
Claudina-3	+ membrana lateral/ ++ estroma	+ estroma	--
Claudina-4	++ estroma	--	+ estroma
Claudina-7	++ membrana basolateral	+++ membrana basal	++ membrana basolateral
D7 SNI			
Claudina-3	+++ membrana lateral	++ membrana lateral / + estroma	++ membrana lateral
Claudina-4	--	+ mitad inferior de la membrana lateral	++ mitad inferior de la membrana lateral
Claudina-7	++ membrana basolateral	+++ membrana basolateral	++ membrana basolateral

-- Sin tinción, +/- tinción apenas perceptible, + tinción baja, ++ tinción moderada, +++ tinción intensa

8.2. Expresión en el día 1 de gestación (D1) de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA.

En el día 1 se encontró que la claudina-3 presenta una distribución en la parte apical y lateral de la membrana. La intensidad de la tinción de claudina-3 es menor en el grupo BPA-L (Fig. 8B) que en el grupo control (Fig. 8A). Para el grupo BPA-H (Fig. 8C) se encontró que la expresión de esta claudina es apenas perceptible en la membrana basal.

La claudina-4 no fue detectada en las células del epitelio uterino (CEU) en el grupo control (Fig. 8D) ni en el grupo BPA-H (Fig. 8F). Sin embargo, fue expresada en el grupo BPA-L (Fig. 8E) a lo largo de la membrana basolateral y alcanzó la parte apical de la membrana plasmática.

La claudina-7 presentó una expresión y distribución similar en el grupo control (Fig. 8G) y en el grupo BPA-H (Fig. 8I), presentándose en la membrana basolateral hasta la parte apical de la membrana plasmática. En contraste, el grupo BPA-L (Fig. 8H) presentó una expresión menor comparada con el grupo control y sólo se localizó en la mitad inferior de la membrana plasmática.

En resumen, los resultados indican que en el D1 la dosis baja de BPA ejerce los efectos más significativos: disminución de claudina-7 y aumento de claudina-4. Además, el BPA actúa de forma dosis-dependiente en la disminución de la expresión de claudina-3 (Ver Tabla 2).

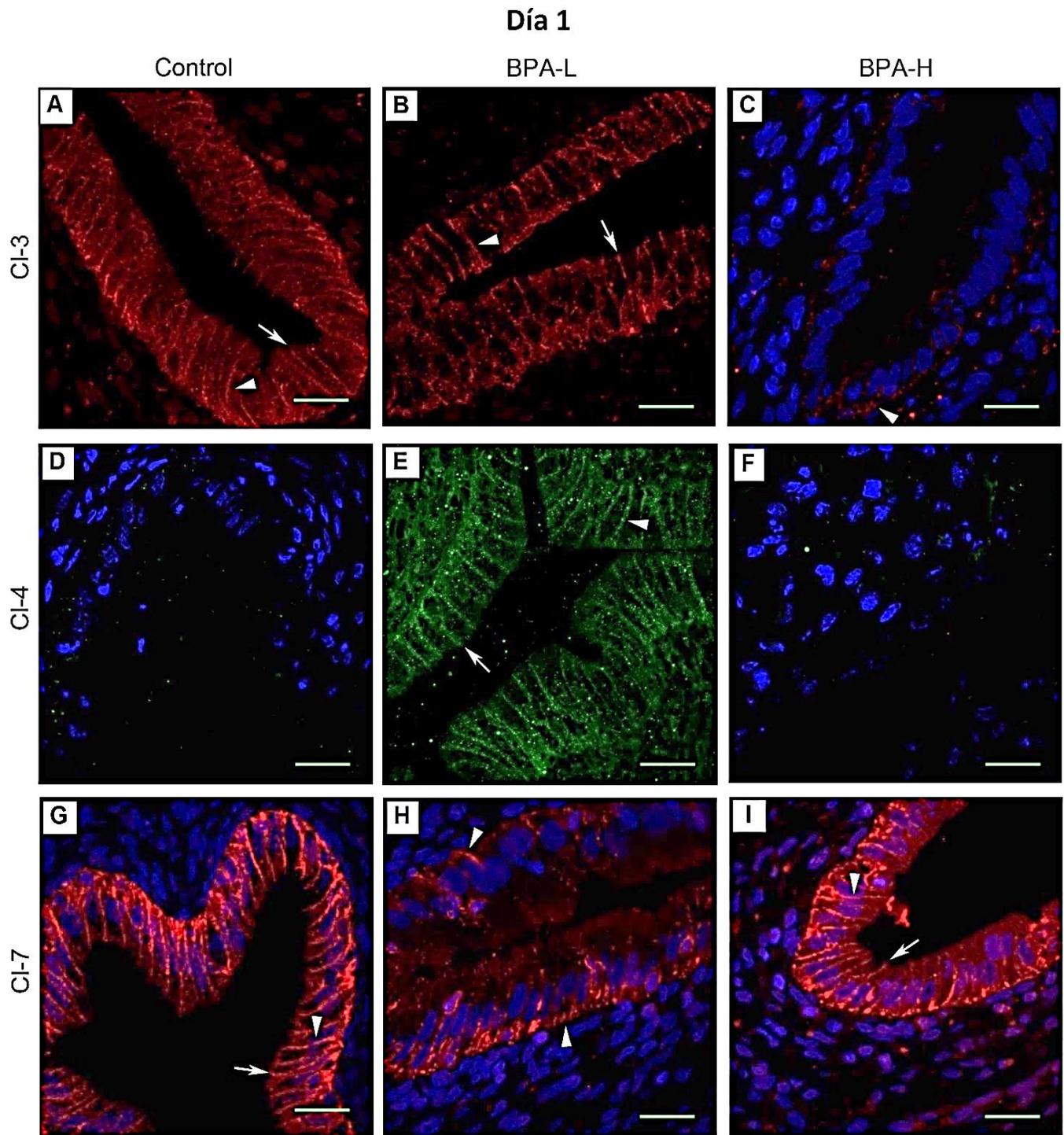


Figura 8. Inmunofluorescencia para detectar la expresión y la localización de las claudinas 3, 4 y 7 en células del epitelio uterino durante el día 1 de gestación, de animales control y animales tratados perinatalmente con bisfenol A dosis baja (BPA-L) y dosis alta (BPA-H). Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral en las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 μ m. n= 5 animales por día de gestación, por tratamiento. Claudina-3=tinción roja, Claudina 4=tinción verde, Claudina 7=tinción roja

8.3. Expresión en el día 3 de gestación (D3) de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA.

Durante el D3 la expresión de la claudina-3 en el grupo control (Fig. 9A) aumentó de forma significativa comparado con el grupo control del D1 (Fig. 8A) pero presenta la misma distribución en la membrana apical y lateral. Los grupos BPA-L (Fig. 9B) y BPA-H (Fig. 9C) presentaron una distribución similar pero se observó una menor expresión de la claudina-3 que en el grupo control.

La claudina-4 no es detectada en CEU del grupo control (Fig. 9D). En contraste, el grupo BPA-L (Fig. 9E) y el grupo BPA-H (Fig. 9F) expresaron esta proteína con una intensidad similar y su localización fue en la membrana basolateral y alcanzó la parte apical de la membrana plasmática.

Así como en el D1, la claudina-7 presentó una distribución y expresión similar en el grupo control (Fig. 9G) y en el grupo BPA-H (Fig. 9I). La claudina-7 fue localizada en la membrana basolateral hasta la parte apical de la membrana plasmática. En cambio, en el grupo BPA-L (Fig. 9H) la expresión es menor comparado con el grupo control y solo se localizó en la mitad inferior de la membrana plasmática.

Estos resultados indican que ambos tratamientos inhiben el aumento normal de claudina-3 que ocurre en el D3. Además, la dosis baja de BPA disminuye la expresión de claudina-7; los dos tratamientos aumentaron la expresión de claudina-4 (Ver tabla 2).

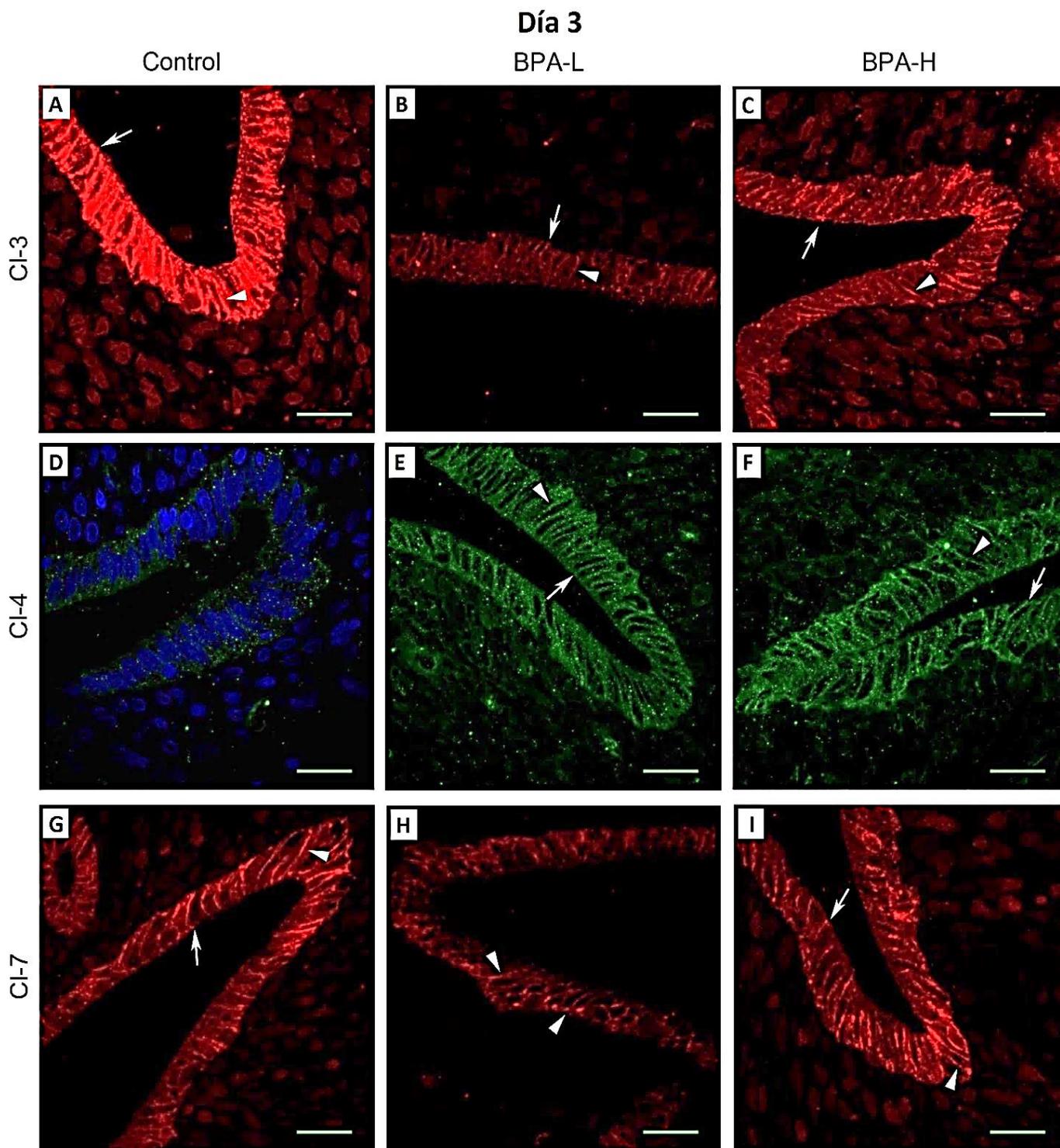


Figura 9. Inmunofluorescencia para detectar la expresión y la localización de las claudinas 3, 4 y 7 en células del epitelio uterino durante el día 3 de gestación, de animales control y animales tratados perinatalmente con bisfenol A dosis baja (BPA-L) y dosis alta (BPA-H). Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral en las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 μ m. n= 5 animales por día de gestación, por tratamiento. Claudina-3=tinción roja, Claudina 4=tinción verde, Claudina 7=tinción roja

8.4. Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 6 de gestación en los sitios de implantación (D6 SI).

Para los días 6 y 7 de gestación se analizaron las claudinas en sitios de implantación (SI) y en sitios de no implantación (SNI).

En el D6 SI, se encontró una señal apenas detectable de claudina-3 en la membrana basolateral de las CEU en los tres grupos estudiados (Fig. 10A-C). Un hecho interesante es que esta proteína también fue expresada en células estromales en el grupo BPA-L (Fig. 10B) (Ver tabla 2).

Por primera vez en este día se detectó la claudina-4 en el grupo control (Fig. 10D) en la membrana basolateral y en las células estromales. En el grupo BPA-L (Fig. 10E) también se observó la presencia de esta proteína en la membrana basolateral hasta la parte apical de la membrana plasmática y en las células estromales. Por último, el grupo BPA-H (Fig. 10F) presentó un marcaje muy tenue en la parte apical de la membrana de las CEU (Ver tabla 2).

La claudina-7 fue localizada en la mitad inferior de la membrana basolateral en el grupo control (Fig. 10G). En el grupo BPA-L (Fig. 10H) la expresión de esta proteína es menor a la observada en el grupo control y se localizó a lo largo de la membrana basolateral. En el grupo BPA-H (Fig. 10I) la claudina-7 presentó una distribución similar a la del grupo control pero la intensidad de la señal fue menor (Ver tabla 2).

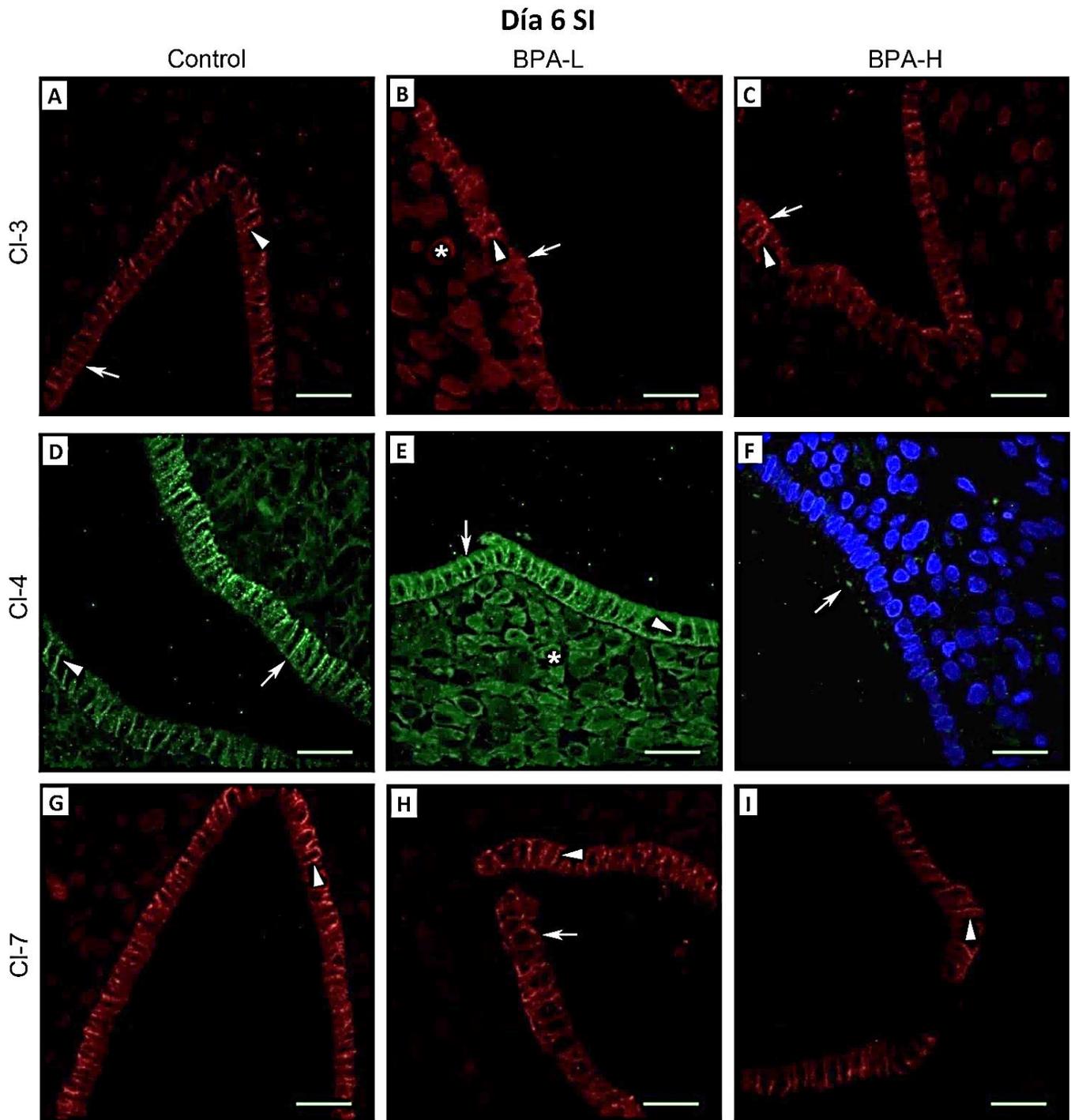


Figura 10. Inmunofluorescencia para detectar la expresión y la localización de las claudinas 3, 4 y 7 en células del epitelio uterino de los sitios de implantación durante el día 6 de gestación, de animales control y animales tratados perinatalmente con bisfenol A dosis baja (BPA-L) y dosis alta (BPA-H). Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral en las CEU, las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral, y los asteriscos la localización en las células del estroma. Barra= 20 μ m. n= 5 animales por día de gestación, por tratamiento. Claudina-3=tinción roja, Claudina 4=tinción verde, Claudina 7=tinción roja

8.5. Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 6 de gestación en los sitios de no implantación (D6 SNI).

En el D6 SNI, se observó una expresión baja de claudina-3 (Fig. 11A-C) en los 3 grupos analizados. En los grupos control (Fig. 11A) y BPA-H (Fig. 11C) esta proteína se localizó en la membrana basolateral de las CEU, pero en el grupo BPA-L (Fig. 11B) se localizó tanto en CEU como en células estromales (Ver tabla 2).

En el grupo control (Fig. 11D) y BPA-H (Fig. 11F) se presentó una señal muy tenue en el marcaje de claudina-4 en la mitad inferior de la membrana basolateral de las CEU. El grupo BPA-L (Fig. 11E) no expresó esta proteína (Ver tabla 2).

En el SNI del D6, en el grupo control (Fig. 11G) se encontró una expresión mayor de claudina-7 que en los SI de este mismo grupo (Fig. 11G) y su distribución es similar: se localizó a lo largo de la membrana plasmática hasta alcanzar la parte apical de la membrana lateral. Los grupos BPA-L (Fig. 11H) y BPA-H (Fig. 11I) presentaron una expresión menor de esta proteína pero presentando la misma distribución que el grupo control (Ver tabla 2).

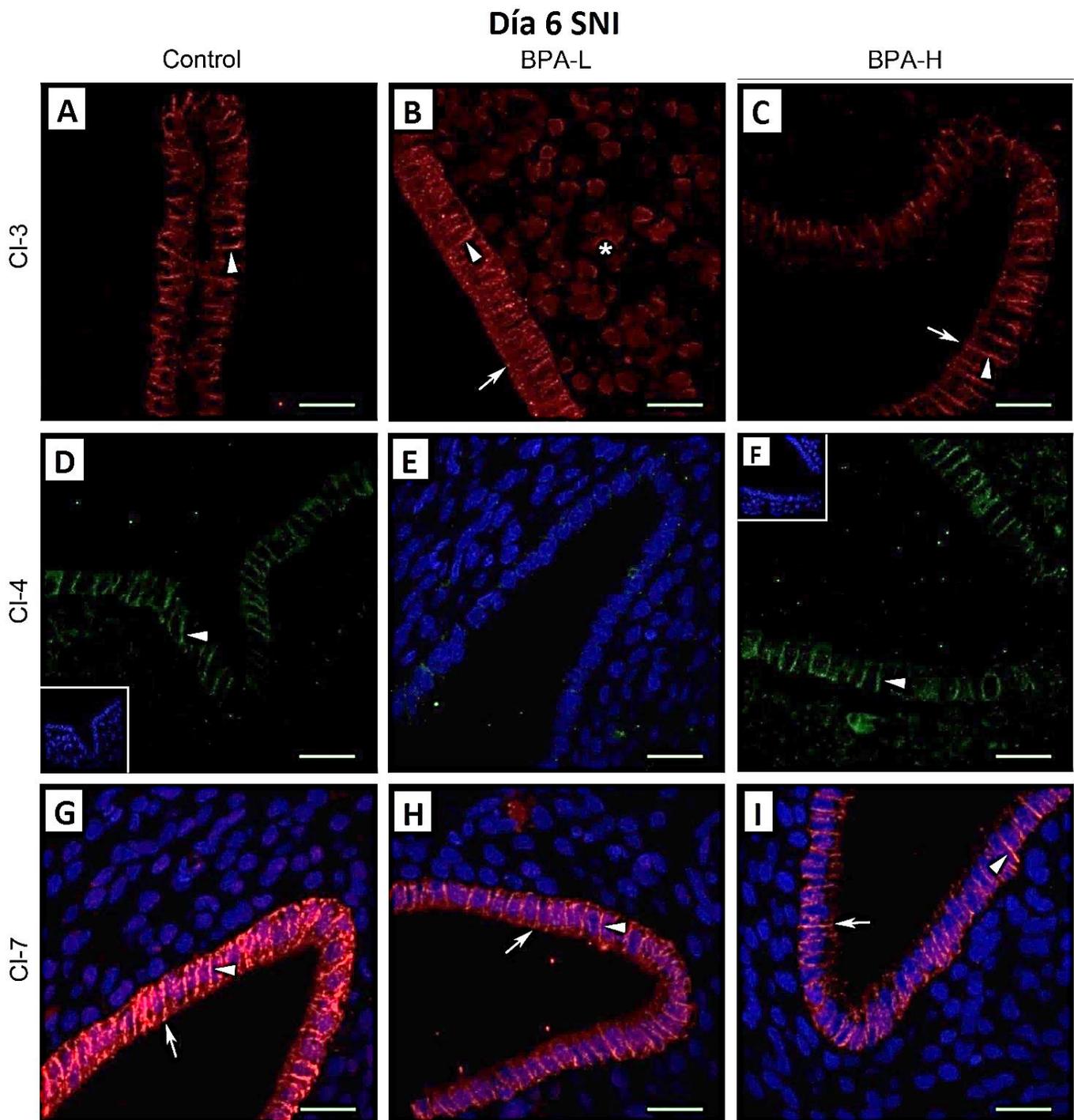


Figura 11. Inmunofluorescencia para detectar la expresión y la localización de las claudinas 3, 4 y 7 en células del epitelio uterino en sitios de no implantación durante el día 6 de gestación, de animales control y animales tratados perinatalmente con bisfenol A dosis baja (BPA-L) y dosis alta (BPA-H). Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral en las CEU, las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral, y los asteriscos la localización en las células del estroma. Barra= 20 μ m. n= 5 animales por día de gestación, por tratamiento. Claudina-3=tinción roja, Claudina 4=tinción verde, Claudina 7=tinción roja

8.6. Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 7 de gestación en los sitios de implantación (D7 SI).

Durante el D7 en los SI, la claudina-3 fue localizada en la membrana apical y basolateral de las CEU en el grupo control (Fig. 12A), mientras que los grupos BPA-L (Fig. 12B) y BPA-H (Fig. 12C) no expresan esta proteína en las CEU. También fue localizada en las células estromales del grupo control (Fig. 12A, asterisco) y en el grupo BPA-L (Fig. 12B, asterisco), pero con menor intensidad respecto al grupo control (Ver tabla 2).

En el grupo control, la claudina-4 se observó expresada en las células estromales (Fig. 12D) pero no en las CEU. Se encontró que en el grupo BPA-L (Fig. 12E) no hay expresión de esta proteína. Sin embargo, en el grupo BPA-H (Fig. 12F) la expresión de claudina-4 en el estroma fue similar al grupo control (Ver tabla 2).

En los grupos control (Fig. 12G) y BPA-H (Fig. 12I), la expresión y distribución de claudina-7 en la membrana basolateral es similar. En contraste, en el grupo BPA-L (Fig. 12H) esta proteína se localizó principalmente en la membrana basal (Ver tabla 2).

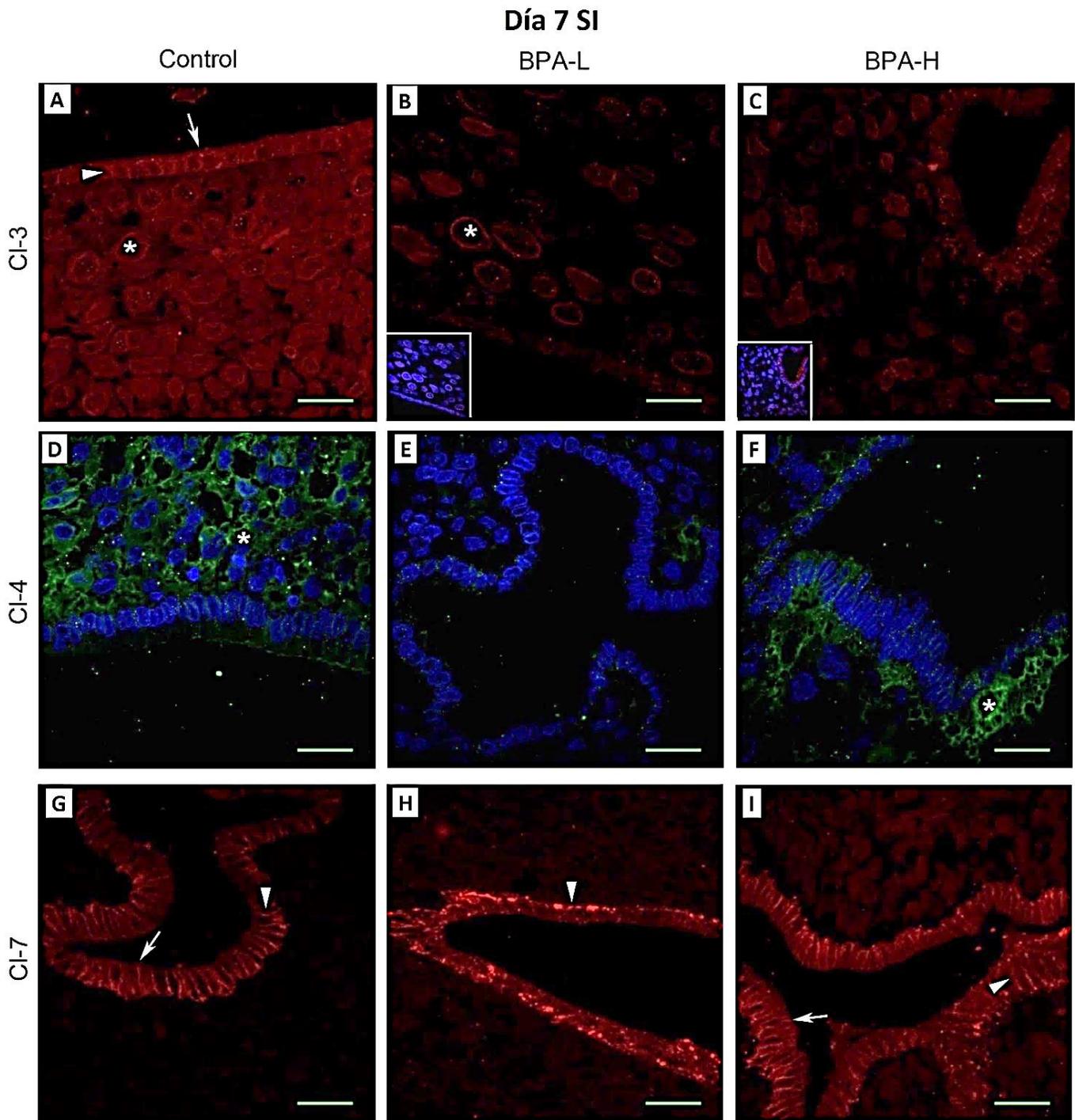


Figura 12. Inmunofluorescencia para detectar la expresión y la localización de las claudinas 3, 4 y 7 en células del epitelio uterino en sitios de implantación durante el día 7 de gestación, de animales control y animales tratados perinatalmente con bisfenol A dosis baja (BPA-L) y dosis alta (BPA-H). Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral en las CEU, las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral, y los asteriscos la localización en las células del estroma. Barra= 20 μ m. n= 5 animales por día de gestación, por tratamiento. Claudina-3=tinción roja, Claudina 4=tinción verde, Claudina 7=tinción roja

8.7. Expresión de las claudinas en el útero de ratas tratadas con BPA en el día 7 de gestación en los sitios de no implantación (D7 SNI).

En el D7 en los SNI, la claudina-3 fue localizada en la membrana apical y lateral en las CEU en los tres grupos (Fig. 13A-C), pero la expresión de esta proteína es menor en los grupos BPA-L (Fig. 13B) y BPA-H (Fig. 13C) que en el grupo control (Fig. 13A) (Ver tabla 2).

En los grupos BPA-L (Fig. 13E) y BPA-H (Fig. 13F), se observó una ligera expresión de la claudina-4 en la membrana basolateral de las CEU. En el grupo control (Fig. 13D) no se observó la presencia de esta proteína (Ver tabla 2).

El grupo control (Fig. 13G) presentó una baja expresión de claudina-7 a lo largo de la membrana basolateral. En los grupos BPA-L (Fig. 13H) y BPA-H (Fig. 13I) se observó mayor expresión de esta proteína pero una distribución similar a la del grupo control (Ver tabla 2).

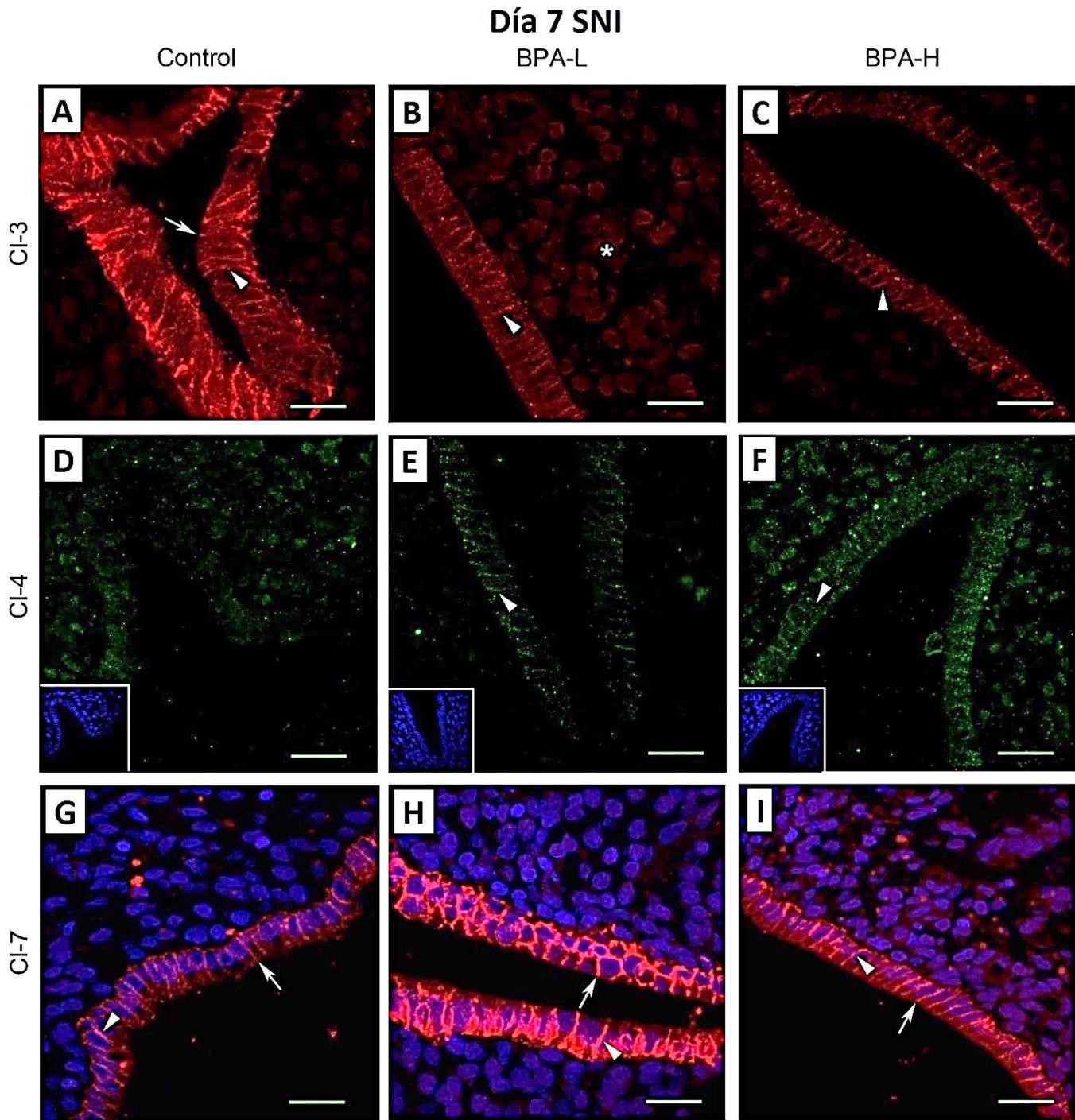


Figura 13. Inmunofluorescencia para detectar la expresión y la localización de las claudinas 3, 4 y 7 en células del epitelio uterino en sitios de no implantación durante el día 7 de gestación, de animales control y animales tratados perinatalmente con bisfenol A dosis baja (BPA-L) y dosis alta (BPA-H). Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral en las CEU, las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral, y los asteriscos la localización en las células del estroma. Barra= 20 μ m. n= 5 animales por día de gestación, por tratamiento. Claudina-3=tinción roja, Claudina 4=tinción verde, Claudina 7=tinción roja

9. Discusión.

Durante las últimas décadas, las tasas de infertilidad y de abortos han aumentado en todo el mundo y actualmente afectan a entre 10-15% de las parejas en los países desarrollados (Vite et al., 2005; Inhorn et al., 2015). Un factor importante de la reducción de la fertilidad es una implantación fallida, que se cree representa el 30-75% de las pérdidas preclínicas del embarazo en los seres humanos (Macklon et al., 2002).

Este incremento en la infertilidad y pérdida temprana del embarazo está relacionado, entre otros factores, a la exposición de disruptores endócrinos, entre los cuales, el BPA es el más estudiado. En humanos, se ha reportado que el porcentaje de pacientes con concentraciones detectables de BPA es significativamente mayor en los pacientes infértiles comparado con las personas fértiles (Caserta et al., 2013A). Así mismo, en estudios de fertilización *in vitro* se ha observado una asociación lineal dosis-respuesta positiva entre la concentración urinaria de BPA y la implantación fallida (Ehrlich et al., 2012).

En modelos animales, se ha comprobado que la exposición al BPA produce efectos adversos en el tracto reproductor femenino y la exposición a este compuesto durante la implantación y placentación reduce el número de fetos y crías, y la tasa de supervivencia antes del destete (Mendoza-Rodríguez et al., 2011; Tachibana et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual el BPA ejerce estos efectos adversos es desconocido. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió si las TJs del epitelio uterino constituyen un objetivo del BPA, cuando el compuesto es administrado durante la gestación y la lactancia.

Para investigar los mecanismos a través de los cuales el BPA interrumpe la implantación, el presente estudio se enfocó en la evaluación de la expresión en los días 1, 3, 6 y 7 de gestación de las proteínas claudina-3, -4 y -7 que forman parte de las TJs de las células del epitelio uterino (CEU). Las TJs participan en la transformación de la membrana plasmática de las CEU que hace que el útero se vuelva receptivo al blastocisto, y regulan el contenido y el volumen del fluido luminal en el útero. Este fluido luminal tiene varias funciones importantes, entre las

que se encuentran la maduración del óvulo y del espermatozoide y proveer de nutrimentos y de moléculas señalizadoras para la implantación del blastocisto (Poon et al., 2013).

Durante el D1, se observa edema en el endometrio, que demanda un movimiento de fluido del estroma hacia el lumen uterino a través de la vía paracelular, el cual es garantizado por la presencia de TJs laxas formadas por hebras paralelas localizadas en la parte apical de la membrana plasmática (Murphy et al., 1981; Murphy et al., 1982). De acuerdo con lo anterior, en el D1 se encontró, en el grupo control, que la presencia de la claudina-3 fue baja en la membrana lateral (Fig. 8A). La claudina-4, que actúa como una barrera catiónica (Van Itallie et al., 2001), estuvo ausente (Fig. 8D), y la claudina-7, que está involucrada en la unión de la célula a la matriz extracelular fue altamente expresada en la membrana basolateral (Fig. 8G). Un patrón de expresión similar de estas proteínas ha sido previamente reportado (Orchard et al., 2002; Nicholson et al., 2010; Poon et al., 2013). Sin embargo, se observó una diferencia en la distribución de la claudina-3, la cual previamente se ha reportado concentrada en el límite entre la membrana apical y lateral (Orchard et al., 2002), mientras que nosotros la detectamos a lo largo de la membrana basolateral. Así mismo, trabajos previos de nuestro laboratorio han detectado la expresión de ZO1 en la parte apical de la membrana lateral y bajos niveles de claudina-1 en la membrana lateral durante el D1 en el grupo control. Las hebras paralelas de las TJ observadas por crio-fractura (Murphy et al., 1981, Murphy et al., 1982) en el D1 pudieran estar formadas por claudina-1 y claudina-3, ya que se ha observado que estas claudinas establecen interacciones heterotípicas entre ellas (Van Itallie et al., 2013) (Fig. 14A). Así mismo, se ha observado que la expresión exógena de la claudina-1 en células L de fibroblastos dan lugar a TJ con hebras lineales, sin entrecruzamientos (Ikenouchi et al., 2008).

Durante el embarazo, la red de filamentos de TJs incrementa en profundidad. Durante el D3, la expresión de claudina-3 aumentó y mantuvo la misma distribución que en D1, en la membrana apical y lateral (Fig. 9A). La claudina-4 sigue ausente en las CEU (Fig. 9D), y la claudina-7 (Fig. 9G) se expresó igual que en el D1 (Fig. 14B).

La implantación del blastocisto, que se da durante el D6, se define como la adhesión irreversible del blastocisto al epitelio uterino, en donde las redes de TJs aumentan 3 veces en

profundidad a lo largo de la membrana lateral (Murphy et al., 1981; Murphy et al., 2000). Las TJs también presentan más filamentos y entrecruzamientos con filamentos vecinos (Murphy et al., 1981; Murphy et al., 1982). En el sitio de implantación (SI) durante el D6, la claudina-3 está presente en la membrana lateral (Fig. 10A) y la claudina-7 en la parte inferior de la membrana basolateral (Fig. 10G). Durante este día, se detectó por primera vez claudina-4 en la membrana basolateral de las CEU (Fig. 10D). En humanos, el incremento de la expresión de RNAm de claudina-4 ha sido reportado durante la ventana de implantación (Carson et al., 2002; Kao et al., 2002), así como en el día 6 de la gestación en ratas (Nicholson et al., 2010), lo que indica que esta proteína tiene una función importante durante la implantación. La sobre-expresión de esta proteína en cultivos celulares incrementa la complejidad de las redes de las TJs (Van Itallie et al., 2001), lo que sugiere que el aumento de claudina-4 observada en el presente trabajo, en el D6 podría ser la responsable de aumentar el número de ramificaciones y entrecruzamientos con filamentos vecinos de TJs que han sido observadas por crío-fractura (Murphy et al., 1981; Murphy et al., 1982). Durante el D6 en los SI, la expresión de claudina-7 disminuyó y la localización cambió de la membrana basolateral observada durante los D1 y D3, a la parte inferior de la membrana basolateral, de acuerdo con resultados previos (Poon et al., 2013).

La claudina-4 disminuye la permeabilidad paracelular del Na^+ (Van Itallie et al., 2001), mientras que la claudina-7 actúa como un canal de Na^+ y una barrera de Cl^- (Alexandre et al., 2005). Además, hay que destacar que durante el período de implantación, los canales transcelulares epiteliales de Na^+ (ENaC) son regulados a la alta en CEU de ratas y son responsables de disminuir el contenido de Na^+ en el fluido luminal (Salleh et al., 2005; Tsang et al., 2001). Por lo tanto, la aparición en el día de implantación de ENaC y claudina-4 junto con la desaparición de claudina-7 de las TJs, garantiza el movimiento transcelular de Na^+ de la membrana apical a la membrana basal del epitelio sin fugas mediante la vía paracelular (Fig. 14C). El transporte de Na^+ , acompañado de la reabsorción de agua del fluido luminal mediante acuaporinas 5 (Lindsay et al., 2004), permite la aposición del blastocisto con el epitelio uterino y favorece el contacto entre sus superficies (Fig. 14C) (Enders et al., 1967; Png et al., 2000).

Un dato interesante es que el pico de la expresión de claudina-4 presente en el SI está ausente en el sitio de no implantación (SNI), sugiriendo que la expresión de claudina-4 es crucial para el proceso de implantación.

La disminución de la expresión de claudina-7 en la parte inferior de la membrana lateral en el D6 en los SI, puede contribuir con la disminución de las adhesiones de la célula a la matriz extracelular que genera que el epitelio este poco adherido durante el día de implantación (Illingworth et al., 2000; Kaneko et al., 2008; Preston et al., 2006). Se ha reportado que la claudina-7 forma un complejo estable con claudina-1 e integrina $\alpha 2$, sugiriendo que el mecanismo por el cual la claudina-7 promueve la adhesión célula-matriz es a través de la estabilización de proteínas integrinas $\alpha 2$ que son responsables de la fijación a los componentes de la matriz extracelular (Ding et al., 2012). En contraste, en el D6 en los SNI, la claudina-7 permanece localizada a lo largo de la membrana basolateral y con una alta intensidad de tinción, reforzando la idea que el comportamiento de las TJs es diferente entre el SI y el SNI.

En el D7 en los SI, en el momento de la penetración del blastocisto a través de las CEU al estroma (Fig. 14D), el resultado más interesante encontrado fue la aparición de claudinas-3 y -4 en células estromales (Fig. 12A y 12D). Esta observación concuerda con otros autores que reportan la presencia ZO-1, claudina-1 y ocludina en las células del estroma del útero de ratón (Paria et al., 1999; Wang et al., 2004), y refuerza la idea de la formación de una barrera en las células estromales que puede proteger al blastocisto de anticuerpos maternos (Fig. 14D).

Los resultados obtenidos de la expresión de TJs en los animales tratados con BPA no siguen un modelo dosis-respuesta. Este comportamiento es común en estudios de disruptores endócrinos, el cual está relacionado con las interacciones entre el ligando (hormona o disruptor endócrino) y el receptor hormonal (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Un cambio importante observado en los animales tratados con BPA fue la presencia de claudina-4 desde el D1 en el grupo BPA-L (Fig. 14E) y desde el D3 en el grupo BPA-H (Fig. 14F) en el epitelio uterino, mientras que en el grupo control, la claudina-4 solo se expresa a un nivel alto en el D6 en el SI. La aparición prematura de claudina-4 podría disminuir la

permeabilidad paracelular del Na^+ en las CEU, por lo que cambia la composición del fluido luminal que a su vez puede obstruir el proceso de implantación.

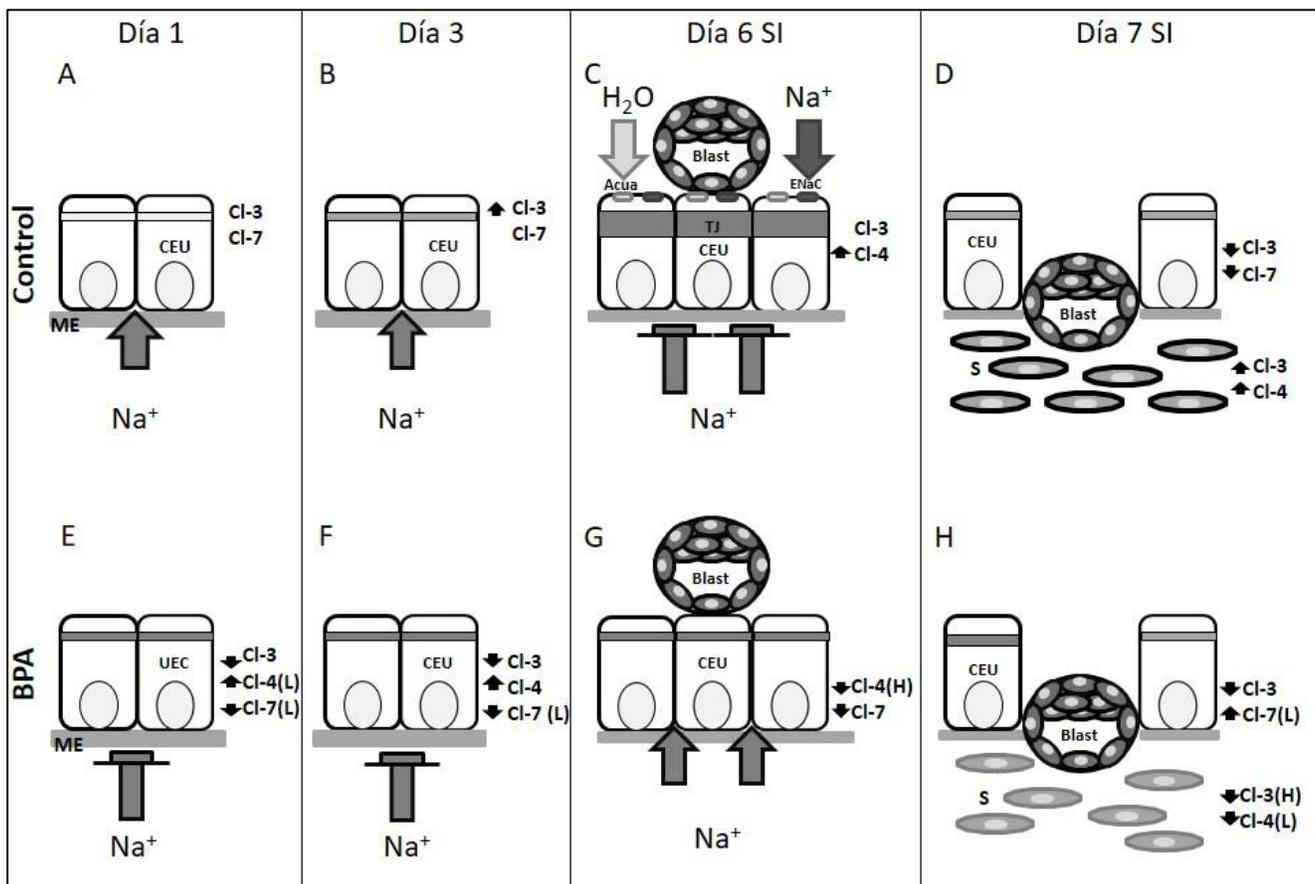


Figura 14. Diagrama que ilustra la estructura de las TJs en las células del epitelio uterino y del estroma durante el embarazo temprano. En los paneles superiores se muestran TJs de animales control, mientras que en los paneles inferiores se muestran TJs de los animales tratados con BPA. En cada panel se indican las proteínas presentes de las TJs. Una barra sombreada más oscura indica mayor número de entrecruzamientos con hebras vecinas. En los animales tratados con BPA las flechas junto al nombre de la proteína indican un aumento (↑), una disminución (↓) o ningún cambio (=) en la expresión de la proteína en comparación con el animal de control en el día de la gestación respectivo. Acua, acuaporina 5; Blast. Blastocisto; CI, claudina; ME, matriz extracelular; ENaC, canales de Na^+ epiteliales; S, células estromales; TJ, proteína de uniones estrechas; CEU, células epiteliales uterinas.

La claudina-7 también presentó cambios importantes entre el grupo control y el grupo BPA-L. Esta claudina se localiza a lo largo de la membrana basolateral en una variedad de epitelios, incluyendo la nefrona e intestino murinos, el epidídimo y útero de ratas durante el ciclo estral y la gestación (Ding et al., 2012; Mendoza-Rodríguez et al., 2005; Poon et al., 2013). De

acuerdo con esto, la claudina-7 se localizó en la membrana basolateral de las CEU durante el D1 y D3 en el grupo control y en el grupo BPA-H, y en la parte inferior de la membrana plasmática en D6 en el SI.

En el grupo BPA-L, la expresión de la claudina-7, durante D1 y D3, disminuyó en las CEU y se concentró en la mitad inferior de la membrana plasmática. Este cambio junto con el aumento de la expresión de la claudina-4, apoya la idea de que el tratamiento con dosis baja de BPA favorece el establecimiento de TJs impermeables a cationes en el D1 (Fig. 14E). Así mismo, dado que la claudina-7 promueve la adhesión de la célula a la matriz extracelular (Ding et al., 2012), la disminución de la expresión de esta proteína en el grupo BPA-L, sugiere una alteración en el mantenimiento de una barrera epitelial uterina intacta durante la fase no receptiva.

Otro cambio importante, ocurrió en el D7 en las células estromales, donde en el grupo BPA-L se observó la aparición de claudina-3 en el SNI y la desaparición de claudina-4 en el SI (Fig. 14H). Mientras tanto, en el grupo BPA-H se encontró que desaparece claudina-3 del SI (Fig. 14H). La ausencia de estas claudinas en el sitio de implantación puede impedir la formación de una barrera entre las células estromales que bloquean el acceso de inmunoglobulinas maternas al embrión.

10. Conclusiones.

La exposición durante la gestación y la lactancia al bisfenol A provoca alteraciones importantes en las proteínas de uniones estrechas (claudina-3, -4 y -7). Estas alteraciones en la conformación de las TJs pueden conducir a cambios en el flujo y el transporte de iones a través del epitelio que bloquean la receptividad del útero ante la implantación del blastocisto, cuando los animales alcanzan la edad adulta y quedan gestantes.

Los efectos observados del bisfenol A no siguen un modelo dosis-respuesta ya que los disruptores endócrinos tienen diversos y complejos mecanismos de acción. Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que la alteración de la expresión de claudinas puede ser uno de los mecanismos de acción por el cual el Bisfenol-A interfiere en la implantación del blastocisto en el epitelio uterino.

El bisfenol A afecta de manera consistente la expresión de la claudina-4, la cual tiene un papel importante en la receptividad del útero al blastocisto, la dosis baja de BPA (0.05 mg / kg / día) provocó una expresión temprana durante la gestación, mientras que la dosis alta de BPA (20 mg / Kg / día) indujo una expresión muy baja en el día de implantación.

11. Perspectivas.

Finalmente, es importante seguir realizando estudios sobre éste y otros disruptores endócrinos con el fin de dilucidar los mecanismos de acción por los cuales afectan la salud reproductiva y la salud en general, ya que el ser humano está en contacto constantemente y de manera inadvertida con estos compuestos sin saber los daños que le pueden ocasionar.

12. Referencias.

Aghajanova L, Giudice LC. **Effect of bisphenol A on human endometrial stromal fibroblasts in vitro.** *Reprod Biomed* 2011; 22:249–56.

Aldad TS, Rahmani N, Leranath C, Taylor HS. **Bisphenol-A exposure alters endometrial progesterone receptor expression in the nonhuman primate.** *Fertil Steril* 2011; 96:175–9.

Alexandre M.D., Lu Q., Chen Y.H., **Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells,** *J Cell Sci* 2005, 118:2683–2693.

Alonso-Magdalena P., Morimoto S., Ripoll C., Fuentes E., Nadal A., **The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance,** *Environ Health Perspect* 2006, 114:106–112.

Alonso-Magdalena P, Vieria E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A. **Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring.** *Environ Health Perspect* 2010, 9:1243-50.

An BS, Ahn HJ, Kang HS, Jung EM, Yang H, Hong EJ, et al. **Effects of estrogen and estrogenic compounds, 4-tert-octylphenol, and bisphenol A on the uterine contraction and contraction-associated proteins in rats.** *Mol Cell Endocrinol* 2013; 375:27–34.

Anchache H, Revel A: **Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation.** *Hum Reprod Update* 2006, 12:731-746.

Anderson James M. and. Van Itallie Christina M, **Physiology and Function of the Tight Junction,** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009, 1:a002584.

Berger RG, Hancock T, deCatanzaro D. **Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice.** *Reprod Toxicol* 2007, 23:138–44.

Bloom MS, Kim D, Vom Saal FS, Taylor JA, Cheng G, Lamb JD, et al. **Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 2011; 96:672–7.

Bosquiazzo VL, Varayoud J, Munoz-de-Toro M, Luque EH, Ramos JG. **Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus.** *Biol Reprod* 2010; 82:86–95.

Brannick KE, Craig ZR, Himes AD, Peretz JR, Wang W, Flaws JA, et al. **Prenatal exposure to low doses of bisphenol A increases pituitary proliferation and gonadotroph number in female mice offspring at birth.** *Biol Reprod* 2012; 87:82.

Bromer J.G., Zhou Y., Taylor M.B., Doherty L., Taylor H.S., **Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response,** *FASEB J* 2010, 7:2273-80.

Bruce M. Carlson, **Human Embriology and Developmental Biology,** 1994, 45.

Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, et al. **Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice.** *Environ Health Perspect* 2011; 119:547–52.

Cantonwine D., Meeker J.D., Hu H., Sanchez B.N., Lamadrid-Figueroa H., Mercado-Garcia A., Fortenberry G.Z., Calafat A.M., Tellez-Rojo M.M., **Bisphenol A exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study,** *Environ Health* 2010, 9:62.

Cao J, Mickens JA, McCaffrey KA, Leyrer SM, Patisaul HB. **Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus.** *Neurotoxicology* 2012; 33:23–36.

Cao J, Joyner L, Mickens JA, Leyrer SM, Patisaul HB. **Sex-specific Esr2 mRNA expression in the rat hypothalamus and amygdala is altered by neonatal bisphenol A exposure.** *Reproduction* 2014; 147:537–54.

Carlisle L, Chan D, Golub, M, Henkel, S, Painter P, Lily Wu k, **Toxicological Profile for Bisphenol A,** 2009. Preparado por Office of Environmental Health Hazard Assessment.

Carson D.S., Largow E., Thathiah A., Al-Shami R., Farach-Carson M.C., Vernon M., Yuan L., Fritz M.A., Lessey B., **Changes in gene expression during early to mid luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high density microarray screening,** *Mol Human Reprod* 2002, 8:871–879.

Caserta D, Bordi G, Ciardo F, Marci R, La Rocca C, Tait S, et al. **The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women.** *Gynecol Endocrinol* 2013A; 29:444–7.

Caserta D., Ciardo F., Bordi G., Guerranti C., Fanello E., Perra G., Borghini F., La Rocca C., Tait S., Bergamasco B., Stecca L., Marci R., Lo Monte G., Soave I., Focardi S., Mantovani A., Moscarini M., **Correlation of endocrine disrupting Chemicals serum levels and white blood cells gene expression of nuclear receptors in a population of infertile women,** *Int J Endocrinol* 2013B, 1–7.

Caserta D, Di Segni N, Mallozzi M, Giovanale V, Mantovani A, Marci R, et al. **Bisphenol A and the female reproductive tract: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies.** *Reprod Biol Endocrinol* 2014,12:37(7827-12-37).

Chen SP, Zhou B, Willis BC, Sandoval AJ, Liebler JM, Kim KJ, Ann DK, Crandall ED, Borok Z. **Effects of transdifferentiation and EGF on claudin isoform expression in alveolar epithelial cells.** *J Appl Physiol* 2005, 98:322–328.

Claverie-Martin, F., Garcia-Nieto, V., Loris, C., et al. **Claudin-19 mutations and clinical phenotype in Spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis.** *PLoS One* 2013, 8,e53151.

Corrales J, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, Brooks BW, **Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation.** *Dose Response* 2015, 13(3).

Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. **Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 285: L1166–L1178.

Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.P., Giudice L.C., Hauser R., Prins G.S., Soto A.M., Zoeller R.T., Gore A.C., **Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement**, *Endocr Rev* 2009, 30:293–342.

Diamond JM. Twenty-first Bowditch lecture. **The epithelial junction: bridge, gate, and fence**. *Physiologist* 1977, 20:10–18.

Dietrich K, Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G: **The role of the endometrium and embryo in human implantation**. *Hum Reprod Update* 2007, 13:365-377.

Ding L., Lu Z., Foreman O., Tatum R., Lu Q., Renegar R., Cao J., Chen Y.H., **Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice**, *Gastroenterology* 2012, 142:305–315.

Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Berry KF, Calafat AM, et al. **Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization**. *Environ Health Perspect* 2012; 120:978–83.

Enders A., Schlafke S., **A morphological analysis of the early implantation stages in the rat**, *Am J Anat* 1967, 120:185–225.

Farquhar MG, Palade GE. **Junctional complexes in various epithelia**. *J Cell Biol* 1963, 17:375–412.

Fernandez M., Bianchi M., Lux-Lantos V., Libertun C., **Neonatal exposure to bisphenol A alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats**, *Environ Health Perspect* 2009, 117:757–762.

Forte M, Mita L, Cobellis L, Merafina V, Specchio R, Rossi S, et al. **Triclosan and bisphenol A affect decidualization of human endometrial stromal cells**. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 422:74–83.

Fujimoto VY, Kim D, vom Saal FS, Lamb JD, Taylor JA, Bloom MS. **Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization**. *Fertil Steril* 2011; 95:1816–9.

Fujita H, Hamazaki Y, Noda Y, et al. **Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis**. *PLoS One* 2012; 7:e52272.

Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A. **Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier**, *J Cell Biol* 2002, 156:1099–1111.

Gamez JM, Penalba R, Cardoso N, Bernasconi PS, Carbone S, Ponzo O, et al. **Exposure to a low dose of bisphenol A impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats: effects on early folliculogenesis**. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 39:9–15.

Ganong, Barrett KE, et al., *Fisiología Médica*, Mc Graw Hill, México, 2012, 24a Edición, 403-404.

Gonzalez-Mariscal L, Namorado Mdel C, Martin D, Sierra G, Reyes JL, **The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney**. *Nephrol Dial Transplant* 2006, 21:2391–2398.

Gong Y, Wang J, Yang J, et al. **KLHL3 regulates paracellular chloride transport in the kidney by ubiquitination of claudin-8.** Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112:4340–4345.

Günzel, D., and Fromm, M. **Claudins and other tight junction proteins.** Compr Physiol 2012, 2:1819–1852.

Günzel D, Yu ASL. **Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability.** Physiol Rev 2013; 93: 525–569.

Hajszan T., Leranath C., **Bisphenol A interferes with synaptic remodeling,** Front Neuroendocrinol 2010, 31: 519–530.

Hashimoto k, Oshima T, Tomita T, Kim Y, Matsumoto T, Joh T, Miwa H. **Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3.** Biochem Biophys Res Commun 2008, 376:154-7.

Hiyama M, Choi EK, Wakitani S, Tachibana T, Khan H, Kusakabe KT, et al. **Bisphenol-A (BPA) affects reproductive formation across generations in mice.** J Vet Med Sci 2011; 73:1211–5.

Hochberg Z, Feil R, Constanca M, Fraga M, Junien C, Carel JC, et al. **Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming.** Endocr Rev 2011; 32:159–224.

Howlander N., Noone A.M., Krapcho M., Garshell J., Miller D., Altekruse S.F., et al, **SEER Cancer Statistics Review, 1975–2012,** National Cancer Institute, based on November 2014 SEER data submission.

Hou J, Gomes AS, Paul DL, Goodenough DA. **Study of claudin function by RNA interference.** J Biol Chem 2006, 281: 36117–36123.

Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al. **Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex.** J Clin Invest 2008; 118:619–628.

Hou J, Renigunta A, Gomes AS, et al. **Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium.** Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106:15350–15355.

Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. **Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization.** Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:18010–18015.

Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer E.S, et al., **Large-Scale Serial Analysis of Gene Expression Reveals Genes Differentially Expressed in Ovarian Cancer,** Cancer Res 2000, 60:6281–6287.

Hugo E.R., Brandebourg T.D., Woo J.G., Loftus J., Alexander J.W., Ben-Jonathan N., **Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes,** Environ Health Perspect 2008, 116(12):1642-7.

Hunt PA, Susiarjo M, Rubio C, Hassold TJ, **The bisphenol A experience: a primer for the analysis of environmental effects on mammalian reproduction,** Biol Reprod 2009, 81:807-813.

Hunt PA, Lawson C, Gieske M, Murdoch B, Smith H, Marre A, et al. **Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey.** Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109:17525–30.

Ikenouchi J., Sasaki H., Tsukita S., Furuse M., Tsukita S., **Loss of occludin affectstricellular localization of tricellulin,** Mol Biol Cell 2008, 19:4687–4693.

Illingworth I.M., Kiszka I., Bagley S., Ireland G.W., Garrod D.R., Kimber S.J., **Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation,** Biol Reprod 2000, 63:1764–1773.

Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y, **Claudin-7 expressed on lateral membrane of rat epididymal epithelium does not form aberrant tight junction strands.** Anat Rec (Hoboken) 2007, 290:1431–1438.

Inhorn Marcia C. and Patrizio Pasquale. **Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century,** Human Reproduction Update, 2015, 21:411–426.

Kaneko Y., Lindsay L.A., Murphy C.R., **Focal adhesions disassemble during early pregnancy in rat uterine epithelial cells,** Reprod Fertil Dev 2008, 20:892–899.

Kao L.C., Tulac S., Lobo S., Imani B., Yang J.P., Germeyer A., Osteen K., Taylor R.N., Lessey B.A., Giudice L.C., **Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation,** Endocrinology 2002, 143:2119–2138.

Khurana S., Ranmal S., Ben-Jonathan N., **Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperproliferation and alterations in estrogen receptor expression,** Endocrinology 2000, 45:12–4517.

Kim HR, Kim YS, Yoon JA, Lyu SW, Shin H, Lim HJ, et al. **Egr1 is rapidly and transiently induced by estrogen and bisphenol A via activation of nuclear estrogen receptor-dependent ERK1/2 pathway in the uterus.** Reprod Toxicol 2014; 50:60–7.

Konrad M, Schaller A, Seelow D, et al. **Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement.** Am J Hum Genet 2006; 79:949–957.

Kooij G, Kopplin K, Blasiq R, et al., **Disturbed function of the blood-cerebrospinal fluid barrier aggravates neuro-inflammation.** Acta Neuropathol 2014, 128(2):267-77.

Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, and Tsukita S, **Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions.** Curr Biol 1999, 9:1035–1038

Kundakovic M, Champagne FA. **Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A.** Brain Behav Immun 2011, 25:1084–93.

Kundakovic, M., Gudsnuk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R.L., Perera, F.P., et al., **Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following lowdose in utero bisphenol A exposure.** Proc Natl Acad Sci USA 2013, 24:9956–9961.

Kundakovic, M., Gudsruk, K., Herbstman, J.B., Tang, D., Perera, F.P., Champagne, F.A., **DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity**. Proc Natl Acad. Sci. USA 2015, 22:6807–6813.

La Rocca C, Tait S, Guerranti C, Busani L, Ciardo F, Bergamasco B, et al. **Exposure to endocrine disruptors and nuclear receptor gene expression in infertile and fertile women from different Italian areas**. Int J Environ Res Public Health 2014; 11:10146–64.

Lang I.A., Galloway T.S., Scarlett A., Henley W.E., Depledge M., Wallace R.B., Melzer D., **Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults**, J Am Med Assoc 2008, 300:1303–1310.

Lee SG, Kim JY, Chung JY, Kim YJ, Park JE, et al. **Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17beta-estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary**. Environ Health Perspect 2013; 121:663–9.

Li WY, Huey CL, Yu AS. **Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron**. Am J Physiol Renal Physiol 2004, 286:F1063–F1071.

Li Q, Davila J, Kannan A, Flaws JA, Bagchi MK, Bagchi IC. **Chronic exposure to Bisphenol A affects uterine function during early pregnancy in mice**. Endocrinology 2016; 157:1749–74.

Lindsay L.A., Murphy C.R., **Redistribution of aquaporins in uterine epithelial cells at the time of implantation in the rat**, Acta Histochem 2004, 106:299–307.

Macklon, N. S., Pieters, M. H., Hassan, M. A., Jeucken, P. H., Eijkemans, M. J., & Fauser, B. C. **A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development**. Human Reproduction 2002, 17:2700–2705.

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

Manfo FP, Jubendradass R, Nantia EA, Moundipa PF, Marthur PP, **Adverse Effects of bisphenol A on male reproductive function**. Rev Environ Contam Toxicol 2014, 228:57-82.

Mannelli C, Szostek AZ, Lukasik K, Carotenuto C, Ietta F, Romagnoli R, et al. **Bisphenol A modulates receptivity and secretory function of human decidual cells: an in vitro study**. Reproduction 2015; 150:115–25.

Markey C.M., Wadia P.R., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M., **Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract**, Biol Reprod 2005, 72:1344–1351.

Martinez Peña AA, Rivera Baños J, et al., **Perinatal administration of bisphenol A alters the expression or tight junction proteins in the uterus and reduces the implantation rate**, Reproductive Toxicology, 2017, 69:106-120.

McLaughlin J, Padfield PJ, Burt JP, O'Neill CA. **Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms**. Am J Physiol Cell Physiol 2004. 287:C1412–C1417.

Meeker J.D., Ehrlich S., Toth T.L., Wright D.L., Calafat A.M., Trisini A.T., Ye X., Hauser R., **Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic**, *Reprod Toxicol* 2010, 30:532–539.

Melnick et al. **Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review**. *Environ Health Perspect.* 2002; 110(4):427-31.

Mendoza-Rodríguez C.A., González-Mariscal L., Cerbón M., **Changes in the distribution of ZO-1 occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle**, *Cell Tissue Res* 2005, 319:315–330.

Mendoza-Rodriguez CA, Garcia-Guzman M, Baranda-Avila N, Morimoto S, Perrot-Appianat M, Cerbon M. **Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring**. *Reprod Toxicol* 2011; 31:177–83.

Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. **Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:16696–16700.

Michikawa, H., Fujita-Yoshigaki, J. and Sugiya, H. **Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells**. *Cell Tissue Res* 2008, 334:255-264.

Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Günzel D, Muller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M. **Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes**. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1798(11):2048-57.

Mitchell LA, Overgaard CE, Ward C, Margulies SS, Koval M. **Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function**. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011, 301:L40–L49.

Mok-Lin E., Ehrlich S., Williams P.L., Petrozza J., Wright D.L., Calafat A.M., Ye X., Hauser R., **Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF**, *Int J Androl* 2010, 33:385–393.

Monje L., Varayoud J., Munoz-de-Toro M., Luque E.H., Ramos J.G., **Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity**, *Reprod Toxicol* 2010, 30(4):625-34.

Morin P.J., **Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy**, *Cancer Res* 2005, 65:9603–9606.

Muñoz de Toro M.M., Markey C.M., Wadia P.R., Luque E.H., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M., **Perinatal exposure to bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice**, *Endocrinology* 2005, 146:4138–4147.

Murphy C.R., Swift J.G., Mukherjee T.M., Rogers A.W., **Effects of ovarian hormones on cell membranes in the rat uterus. II. Freeze-fracture studies on tight junctions of the lateral plasma membrane of the luminal epithelium**, *Cell Biophys* 1981, 3:57–69.

Murphy C.R., Swift J.G., Mukherjee T.M., Rogers A.W., **The structure of tight junctions between uterine luminal epithelial cells at different stages of pregnancy in the rat**, Cell Tissue Res 1982, 223:281–286.

Murphy CR, Shaw TJ., **Plasma membrane transformation: a common response of uterine epithelial cells during the periimplantation period**. Cell Biol Int 1994, 18:1115–1128.

Murphy et al. **The plasma membrane transformation facilitates pregnancy in both reptiles and mammals**. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2000, 127(4):433-9.

Murray T.J., Maffini M.V., Ucci A.A., Sonnenschein C., Soto A.M., **Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure**, Reprod Toxicol 2007, 23:383–390.

Nah WH, Park MJ, Gye MC. **Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice**. Clin Exp Reprod Med 2011; 38:75–81.

Narita S.-i., Goldblum R.M., Watson C.S., Brooks E.G., Estes D.M., Curran E.M., et al., **Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators**, Environ Health Perspect 2006, 115:48–52.

National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Health & Education: **Endocrine Disruptors**, {<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>}. Visitada el 9 de septiembre de 2016.A.

National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Health & Education: **Bisphenol A (BPA)**, {<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa/index.cfm>}. Visitada el 9 de septiembre de 2016.B.

Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, Garcia-Galiano D, Pineda R, et al. **Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation**. Endocrinology 2009; 150:2359–67.

Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. **Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract**. Reprod Toxicol 2007; 24:253–8.

Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. **Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life**. Environ Health Perspect 2009; 117:879–85.

Nicholson DO, Lindsay LA, Murphy CR, **Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy**. Acta Histochem. 2010, 112:42–52

Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S. **Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice**. Cell Biol 2003, 161:653–660.

Norwitz, E. R.; Schust, D. J. & Fisher, S. J. **Implantation and the survival of early pregnancy**. N Engl J Med 2001, 345:1400-8.

Nubel T, Preobraschenski J, Tuncay H, Weiss T, Kuhn S, Ladwein M, Langbein L, Zoller M. **Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression.** Mol Cancer Res 2009, 7:285–299.

Orchard M.D., Murphy C.R., **Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat,** Acta Histochem 2002, 104:149–155.

Paria B.C., Zhao X., Das S.K., Dey S.K., Yoshinaga K., **Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization,** Dev Biol 1999, 208:488–501.

Patel Ravi M., Myers Loren S., et al., **Probiotic Bacteria Induce Maturation of Intestinal Claudin 3 Expression and Barrier Function,** The American Journal of Pathology, 2012, 180(2):626-635.

Perera, F., Vishnevetsky, J., Herbstman, J.B., Calafat, A.M., Xiong, W., Rauh, V., et al., **Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort.** Environ Health Perspect 2012, 120:1190–1194.

Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, Hunt PA, Ehrlich S, Hauser R, et al. **Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007–2013.** Environ Health Perspect 2014; 122:775–86.

Png F.Y., Murphy C.R., **Closure of the uterine lumen and the plasma membrane transformation do not require blastocyst implantation,** Eur J Morphol 2000, 38:122–127.

Pollard R.M., Finn C.A., **Ultrastructure of the uterine epithelium during the hormonal induction of sensitivity and insensitivity to a decidual stimulus in the mouse.** J Endocrinol 1972, 55:293–298.

Poon C.E., Madawala R.J., Day M.L., Murphy C.R., **Claudin 7 is reduced in uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat,** Histochem Cell Biol 2013, 139:583–593.

Preston A.M., Lindsay L.A., Murphy C.R., **Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: an ultrastructural and morphometric study,** J Morphol 2006, 267:103–108.

Prusinski L, Al-Hendy A, Yang Q **Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets.** Gynecol Obstet Res 2016, 3(1):1-6.

Psychoyos A, **Hormonal control of uterine receptivity for nidation.** J Reprod Fertil Suppl 1976, 25:17–28

Psychoyos A, **Uterine receptivity for nidation.** Ann N Y Acad Sci 1986, 476:36–42

Qiu W, Zhao Y, Yang M, Farajzadeh M, Pan C, Wayne NL. **Actions of bisphenol A and bisphenol S on the reproductive neuroendocrine system during early development in zebrafish.** Endocrinology 2016; 157:636–47.

Ramos J.G., Varayoud J., Kass L., Rodriguez H., Costabel L., Munoz de Toro M.M., Luque E.H., **Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis in prenatally exposed male rats,** Endocrinology, 2003, 144:3206–3215.

- Reiter B, Kraft R, Günzel D, Zeissig S, Schulzke JD, Fromm M, Harteneck C. **TRPV4 mediated regulation of epithelial permeability.** FASEB J 2006, 20: 1802–1812.
- Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, Tauc M, Gonzalez Mariscal L. **The renal segmental distribution of claudins changes with development.** Kidney Int 2002; 62:476–487.
- Rodriguez HA, Santambrosio N, Santamaria CG, Munoz-de-Toro M, Luque EH. **Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary.** Reprod Toxicol 2010; 30:550–7.
- Rogers P.A.W., Macpherson A.M., Beaton L., **Reduction in endometrial neutrophils in proximity to implanting rat blastocyst,** J Reprod Fert 1992, 96:283-288.
- Rubin, Beverly S. **Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects.** J Steroid Biochem Mol Biol 2011, (1-2):27-34.
- Salleh N., Baines D.L., Naftalin R.J., Milligan S.R., **The hormonal control of uterine luminal fluid secretion and absorption,** J Membr Biol 2005, 206:17–28.
- Schneeberger, E.E., Lynch, R.D., 2004. **The tight junction: a multifunctional complex.** Am J Physiol Cell Physiol 2004, 286:C1213–C1228.
- Schonfelder G., Wittfoht W., Hopp H., Talsness C.E., Paul M., Chahoud I., **Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit,** Environ Health Perspect. 2002, 110: A703–7.
- Shang, X., Lin, X., Alvarez, E., et al. **Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases.** Neoplasia, 2012, 14, 974–985.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. **Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption.** Science 1999; 285:103–106.
- Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Laukova M, Mlyncek M. **Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen.** J Cell Physiol 2009; 219:415–20.
- Söderman, J., Noren, E., Christiansson, M., et al. **Analysis of single nucleotide polymorphisms in the region of CLDN2-MORC4 in relation to inflammatory bowel disease.** World J Gastroenterol 2013, 19:4935–4943.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. **Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia.** J Cell Biol 1986; 103:755–766.
- Sugiura-Ogasawara M., Ozaki Y., Sonta S.-I., Makino T., Suzumori K., **Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage,** Hum Reprod. 2005, 20:2325–2329.
- Tachibana T., Wakimoto Y., Nakamuta N., Pichitraslip T., Wakitani S., Kusakabe K., Hondo E., Kiso Y., **Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice,** J Reprod Dev 2007, 53:509–514.

Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, et al. **Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure.** Environ Health Perspect 2011, 119: 422–430.

Tatum R, Zhang Y, Salleng K, et al. **Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice.** Am J Physiol Renal Physiol 2010, 298:F24–F34.

Thorleifsson G, Holm H, Edvardsson V, et al. **Sequence variants in the CLDN14 gene associate with kidney stones and bone mineral density.** Nat Genet 2009, 41:926–930.

Tsang L.L., Chan L.N., Wang X.F., So S.C., Yuen J.P., Fiscus R.R., Chan H.C., **Enhanced epithelial Na (p) channel (ENaC) activity in mouse endometrial epithelium by upregulation of gammaENaC subunit,** Jpn J Physiol 2001, 51:539–543.

Tsukita, Sh., Furuse, M., Itoh, M., **Multifunctional strands in tight junctions.** Nat Rev Mol Cell Biol 2001, 2:285–293.

Van Itallie CM, and Anderson JM, **Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts.** J Cell Sci 1997, 110:1113–1121.

Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM, **Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability,** J Clin Invest 2001, 107:1319–1327.

Van Itallie CM, Gambling TM, Carson JL, Anderson JM. **Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization.** J. Cell Sci. 2005, 118:1427–36.

Van Itallie C.M., Anderson J.M., **Claudin interactions in and out of the tight junction,** Tissue Barriers 2013, 1, e25247.

Vandenberg L.N., Maffini M.V., Schaeberle C.M., Ucci A.A., Sonnenschein C., Rubin B.S., Soto A.M., **Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice,** Reprod Toxicol 2008, 26:210–219.

Vandenberg LN, Maffini M.V., Sonnenschein C., Rubin B.S., Soto A.M., **Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption,** Endocr Rev 2009, 30:75–95.

Vandenberg LN, Chahoud I, Heindel JJ, Padmanabhan V, Paumgarten FJ, Schoenfelder G **Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A.** Environ Health Perspect 2010, 8:1055-70.

Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Lower M, Munoz-de-Toro M, Luque EH. **Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites.** Endocrinology 2011; 152:1101–11.

Veiga-Lopez A, Luense LJ, Christenson LK, Padmanabhan V. **Developmental programming: gestational bisphenol-A treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression.** Endocrinology 2013; 154:1873–84.

Vigizzi L, Bosquiazzo VL, Kass L, Ramos JG, Munoz-de-Toro M, Luque EH. **Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment.** Reprod Toxicol 2015; 52:83–92.

Vite Vargas J.A., Ortiz Núñez D.A., Hernández Marín I., Tovar Rodríguez J.M. **Epidemiological analysis of infertility in a Mexican population**, *Ginecol Obstet Mex* 2005, 73:360–364.

Wang W, Hafner KS, Flaws JA. **In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse**. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 76:157–64.

Wang X., Matsumoto H., Zhao X., Das S.K., Paria B.C., **Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation**, *J Cell Sci* 2004, 117:53–62.

Wang X, Chang F, Bai Y, Chen F, Zhang J, Chen L. **Bisphenol A enhances kisspeptin neurons in anteroventral periventricular nucleus of female mice**. *J Endocrinol* 2014: 221(2):201-213.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. **Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme**. *Acta Neuropathol* 2003, 105:586– 592.

Wolstenholme, J.T., Rissman, E.F., Connelly, J.J., **The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior**. *Horm Behav* 2011, 59(3):296–305.

World Health Organization (WHS). Children´s environmental health: **Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)** <http://www.who.int/ceh/risks/cehemerging2/en/>. Visitada el 9 de septiembre de 2016. A.

World Health Organization (WHS). Sexual and reproductive health: **Infertility definitions and terminology** <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>. Visitada el 17 de enero de 2017. B.

Wray C, Mao Y, Pan J, Chandrasena A, Piasta F, Frank JA. **Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury**. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009, 297:L219–L227.

Xi W, Lee CK, Yeung WS, Giesy JP, Wong MH, Zhang X, et al. **Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice**. *Reprod Toxicol* 2011; 31:409–17.

Xiao S, Diao H, Smith MA, Song X, Ye X. **Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice**. *Reprod Toxicol* 2011; 32:434–41.

Xiaoyan Pan, Xuenan Wang, Yanmei Sun, Zhaohua Dou, Zhixin Li, **Inhibitory effects of preimplantation exposure to bisphenol-A on blastocyst development and implantation**, *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(6):8720-8729.

Yan H., Takamoto M., Sugane K., **Exposure to Bisphenol A prenatally or in adulthood promotes T (H)2 cytokine production associated with reduction of CD4CD25 regulatory T cells**, *Environ Health Perspect.* 2008, 116:514–519.

Yang Y.J., Hong Y.C., Oh S.Y., Park M.S., Kim H., Leem J.H., Ha E.H., **Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women**, *Environ Res* 2009, 109:797–801.

Yang X, Zhou Y, Peng S, Wu L, Lin HY, Wang S, et al. **Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis.** *Reproduction* 2012; 144:235–44.

Yoshino S., Yamaki K., Li X., Sai T., Yanagisawa R., Takano H., et al., **Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice,** *Immunology*, 2004, 112:489–495.

Zhang HQ, Zhang XF, Zhang LJ, Chao HH, Pan B, Feng YM, et al. **Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes.** *Mol Biol Rep* 2012; 39:5651–7.

Zhang T, Li L, Qin XS, Zhou Y, Zhang XF, Wang LQ, et al. **Di-(2-ethylhexyl)phthalate and bisphenol A exposure impairs mouse primordial follicle assembly in vitro.** *Environ Mol Mutagen* 2014; 55:343–53.

13. Anexo 1.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron publicados en el artículo *Perinatal administration of bisphenol A alters the expression of tight junction proteins in the uterus and reduces the implantation rate*, en la revista *Reproductive Toxicology*, en el 2017, volumen 69, páginas 106-120.



Perinatal administration of bisphenol A alters the expression of tight junction proteins in the uterus and reduces the implantation rate



Annia A. Martínez-Peña^a, Jorge Rivera-Baños^a, Laura L. Méndez-Carrillo^a,
Marcos I. Ramírez-Solano^a, Aarón Galindo-Bustamante^a, J. Carlos Páez-Franco^a,
Sumiko Morimoto^b, Lorenza González-Mariscal^c, M. Esther Cruz^d,
C. Adriana Mendoza-Rodríguez^{a,*}

^a Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

^b Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F. 14080, México

^c Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, México, D.F. 07300, México

^d Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Laboratorio de Neuroendocrinología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 15000, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2016

Received in revised form 7 February 2017

Accepted 13 February 2017

Available online 17 February 2017

Keywords:

Bisphenol-A

Implantation

Tight junctions

Claudins

ZO-1

ABSTRACT

We studied the effect of bisphenol-A (BPA) administration to rats, during the perinatal period, on the fertility of F1 generation and on the expression of tight junction (TJ) proteins in the uterus during early pregnancy. Pregnant Wistar dams (F0) received: BPA-L (0.05 mg/kg/day), BPA-H (20 mg/kg/day) or vehicle, from gestational day (GD) 6 to lactation day 21. F1 female pups were mated at 3 months of age and sacrificed at GD 1, 3, 6, and 7. Serum hormonal levels, ovulation rate, number of implantation sites and expression of TJ proteins in the uterus of F1 females were evaluated. BPA treatment induced no change in ovulation rate, but induced alterations in progesterone (P₄) and estradiol (E₂) serum levels, and in implantation rate. With regards to TJ proteins, BPA-H increased claudin-1 during all GDs; eliminated the peaks of claudins -3 and -4 at GD 3 and 6, respectively; and decreased claudin-7 at GD 6, ZO-1 from GD 1–6, and claudin-3 at GD 7 in stromal cells. BPA-L instead, eliminated claudin-3 peak at GD 3, increased claudin-4 and decreased claudin-7 from GD 1–6, decreased claudin-1 at GD 3 and 7 and claudin-4 at GD 7 in stromal cells. BPA-L also decreased ZO-1 at GDs 1 and 3 and increased ZO-1 at GD 6. Thus, BPA treatment during perinatal period perturbed, when the animals reached adulthood and became pregnant, the particular expression of TJ proteins in the uterine epithelium and reduced in consequence the number of implantation sites.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

An endocrine-disrupting compound was defined by the U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) as an exogenous agent that interferes with synthesis, secretion, transport, metabolism, binding action, or elimination of natural blood-borne hormones that are present in the body and are responsible for homeostasis, reproduction, and developmental process. Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor with estrogenic-like activities in hormone sensitive and dependent tissues in both females and males [1]. BPA is a monomer component of polycarbonate plastics and

epoxy resins that leaches from dental sealants and the linings of food cans, polycarbonate baby bottles and other beverage containers. BPA is ubiquitous in the environment and humans are routinely exposed to it [2].

Perinatal exposure to endocrine disruptors, in particular those with estrogenic activity, can have long lasting consequences, especially when occurring during critical periods of development of the reproductive tract [1,3]. These endocrine disruptors alter the “organizational” effects produced by hormones. Some alterations are measurable immediately upon exposure and persist throughout the life of the animal [4], while other are undetectable at the time of exposure, but become apparent in subsequent adulthood [4]. There is evidence that alterations of the organizational effects produced by hormones by estrogenic endocrine disruptors such as BPA are mediated by epigenetic alterations in DNA [4] and constitute the subject of intense current investigation.

* Corresponding author at: Facultad de Química, UNAM, Circuito Interior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D.F. México.
E-mail address: adrimed@yahoo.com (C.A. Mendoza-Rodríguez).

BPA administered to dams is transported in 30 min from the mother to the fetus [5], activating estrogen receptors [6], and any level of exposure may cause endocrine or reproductive abnormalities. Surprisingly, low doses may even exert more potent effects than higher doses. Thus, endocrine disruptors exert non-traditional dose-response curves such as U or inverted-U shaped curves [1]. It has been observed that very low doses of BPA, in the range of human exposures, can produce adverse effects in the female reproductive tissue if administered during development. These effects include early onset of vaginal opening and puberty, alterations in estrous cyclicity, plasma levels of luteinizing hormone, uterine and vaginal histology, mammary gland and ovarian morphology [7–13]. BPA exposure during implantation and placentation also decreases the number of fetus and pups, and the survival rate before weaning [14]. Taken together, these observations suggest that BPA exposure in utero alters reproductive performance and the formation of reproductive organs.

In humans, some correlations between BPA and infertility have been reported. Among women from infertility clinics, a higher urinary BPA concentration was associated with a lower antral follicle count, raising concern for a possible accelerated follicle loss and reproductive aging [15]. In another study, the percentage of patients with detectable BPA concentrations was found to be significantly higher in the infertile patients compared with fertile subjects [16]. Other authors observed a positive linear dose-response association between BPA urinary concentrations and implantation failure in *in vitro* fertilization studies [17].

Successful implantation of the blastocyst during early pregnancy involves a series of hormonally driven changes in uterine epithelial cells (UEC) that make them receptive to attachment by trophoblastic cells. These changes, known as the “plasma membrane transformation”, include alterations in the constitution of tight junctions (TJs) [18]. These structures regulate the content and volume of the luminal fluid in the uterus, as they control the movement of solutes along the paracellular pathway of epithelial cells and maintain cell polarity by separating the apical and basolateral domains of the plasma membrane.

More than 40 different proteins have been identified at the TJs, and this intricate array of molecules are organized as a group of transmembrane proteins coupled to a set of submembranous proteins, that act as bridges, connecting the complex to the actin cytoskeleton. Among the integral TJ proteins, junctional adhesion molecules (JAMs) work as landmarks that define the site where TJ will be formed [19], occludin and claudins are constituents of the TJ filaments observed by freeze-fracture [20] and claudins form ionic pores and barriers responsible for the ionic selectivity of the paracellular pathway [19]. Among the submembranous proteins of the TJ, ZO-1 has been the more thoroughly studied and is considered a scaffold that brings structurally diverse, but functionally connected, proteins into close proximity at the TJ.

Freeze-fracture studies of UEC have shown that during gestational day (GD) 1, TJ strands are parallel and localize at the uppermost portion of the lateral membrane, while on GD 5 the TJ network extends further down on the lateral plasma membrane and strands become more complex and interconnected [21,22]. Accordingly, a higher expression of ZO-1, occludin and claudins-1, -3 and -4 are observed in the TJ region of UEC at GD 6, when implantation takes place, in comparison to GD 1 [18,23].

We are interested in uncovering the mechanisms triggered by BPA that negatively affect female fertility. For this purpose, we have studied the effect of BPA administration at low (L) or high (H) concentration in rats, during the perinatal period, on hormonal serum levels, the implantation rate and on the expression of TJ proteins in the uterus during early pregnancy.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Animal maintenance and handling was carried out in accordance with the Guidelines of the Mexican Law of Animal Protection and with the approval of the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals from Facultad de Química, UNAM. Wistar rats were obtained from the animal center UNAM-Harlan. Adult pregnant female rats (200–250 g) were used. Animals were maintained under a 12:12 h light:dark cycle with commercial food (Tekland Global Rodent Diet T.2018S.15, Envigo, USA) and tap water available ad libitum. Three groups of $n=5$ rats each were done: BPA low dose (BPA-L) received 0.05 mg/kg/day, BPA high dose (BPA-H) received 20 mg/kg/day and the control group only received the vehicle. Experimental females were exposed to BPA in their drinking water; BPA was diluted in water-ethanol 0.1%. BPA was given from GD 6 to day 21 of lactation. For BPA, the lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) dose for oral exposure in rats is 50 mg/kg/d, as determined by the US EPA. The National Toxicology Program (NTP) suggested a cut-off dose of 5 mg BPA/kg/day for the classification of low-dose effects, regardless of the administration route, duration of exposure, or the age/life stage at which the exposure occurred [24]. Thus, the low dose (BPA-L) used in this study is 100 times smaller than the low-dose cut-off suggested by NTP and is similar to the safe dose or acceptable daily intake level (ADI) established by the US EPA. Meanwhile, the high dose (BPA-H) is 4 times higher than that of the low-dose cut-off suggested by the NTP and 2.5 fold lower than the US EPA LOAEL. We used glass water bottles to ensure that related compounds did not leach from plastic water bottles. Control females were given water containing only 0.1% ethanol (vehicle). Upon delivery litters were adjusted to 10 pups per dam.

Beginning on the day of weaning, F1 pups were supplied with unadulterated drinking water, and the ratio of females to males F1 offspring was evaluated. Cyclicity of F1 female offspring was determined at 3 months of age by daily vaginal smears for 4 consecutive weeks. Females were mated with an expert Wistar male with proven fertility, starting at 16:00 h of proestrus day. Mating was confirmed by the presence of spermatozooids in a vaginal smear the next morning, this was designated GD 1. Groups of five F1 female offspring were sacrificed at GD 1, 3, 6 and 7. At each GD, animals from different litters were used to avoid potential litter effects.

Implantation sites (IS) on GD 6 and 7 were identified by intravenous injection of 0.35 ml of 0.5% Evans blue dye (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) in saline, 20 min before animal sacrifice. Extravascular dye accumulated in areas of the uterus with increased capillary permeability that correspond to regions where blastocysts had attached. This condition made IS visible as discrete blue bands. IS and non-implantation sites (NIS) were separated for further studies. Uterine horns were fixed with ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) for 2 h. Tissues were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, cleared with xylene, and embedded in paraffin (Oxford Labware, St. Louis, MO). Tissue sections (5 μ m thick) were cut and mounted on poly-L-lysine coated slides.

2.2. Assessment of reproductive parameters

The ovulation rate was studied in the F1 offspring females of all treatment groups, sacrificed at GD 1. Left and right oviducts were dissected and the number of ova per animal was counted with the aid of a dissecting microscope (Leica EZ4D, Leica Microsystems GmbH, Germany) as previously described [25].

The number of IS was studied, as previously described, in the F1 offspring females of all treatment groups, sacrificed at GD 6 and 7.

2.3. Immunohistochemistry

Mounted tissue sections were cleared of paraplast with xylene, rehydrated and processed for immunohistochemistry [26]. Briefly, rehydrated sections were microwaved (two cycles of 10 min each) in 0.01 M sodium citrate, pH 6, and cooled to room temperature. After rinsing in PBS, the slides were incubated in 0.5% Triton X-100, and non specific immunoglobulin binding was blocked by incubating sections in 5% bovine serum albumin (BSA) for 30 min. The sections were incubated overnight in a humidified chamber at 4 °C with rabbit antibodies against ZO-1 or claudins -1, -3, and -7, or mouse antibody against claudin-4, at a concentration of 1.25 µg/ml for all antibodies, except claudin-4 that was 2.50 µg/ml (Cat No. 61-7300, 51-9000, 34-1700, 34-9100, 32-9400, respectively, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As negative control, two different procedures were used. In the first one, the primary antibody was omitted, and in the second one, the slides were incubated with normal rabbit IgG or normal mouse IgG (Cat No. sc-2027, sc-2025, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) in place of the primary antibody. After washing with PBS, the sections were incubated for 2 h at room temperature with TRITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Cat No. 711-025-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA) or with Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse (Cat No. A11001 Invitrogen, NY, USA) at a 1:100 dilution and then washed with PBS to remove unbound secondary antibody. Slides were mounted with the Fluoroshield with DAPI (Cat No. F6057, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). All the slides for each protein were stained at the same time in order to ensure that the staining procedure was the same for all samples. The fluorescence was examined using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000) with diode lasers and employing the Olympus confocal software. Optical sections of 1 µm were performed, and the images shown represent the projection of the sections made for each uterus. All images were taken with a 100 X objective lens and all the images of each protein were collected with the same laser transmissivity, in order to have comparable results. In all the images, with the exception of Cl-4, DAPI staining was collected with a laser excitation wavelength of 405 nm and an emission wavelength of 461 nm and a transmissivity of 5%. For Cl-4, the transmissivity was of 3%. For ZO-1, Cl-1, and Cl-3, TRITC staining was collected with a laser excitation wavelength of 559 nm and an emission wavelength of 591 nm and a transmissivity of 37%. For Cl-7, TRITC staining was collected at the same excitation and emission wavelength as previously specified, but with a transmissivity of 50%. For Cl-4, Alexa-Fluor 488 was collected with a laser excitation wavelength of 473 nm, an emission wavelength of 519 nm and a transmissivity of 50%. Two independent observers blind to the treatment evaluated the staining intensity of each protein and assigned the following scores: -, no staining; +, low staining; ++, moderate staining; +++, intense staining. Two sections were analyzed for each animal, n = 5 animals per studied group per day. All images are representative of five independent experiments.

2.4. Protein extraction and Western blot analysis

Uterine horns were cut open longitudinally and uterine luminal epithelial cells from GD 1, 3, 6 (IS) and 7 (IS) pregnant rats were isolated from each uterine horn using sterile surgical blades and placed immediately into RIPA buffer (PBS 1 X, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycolate, 1% Nonidet P-40) and 1% protease inhibitor cocktail (Complete ULTRA tables) (Roche, Basel, Switzerland). To confirm that the UEC were adequately isolated from the uterus, the remaining uterine tissue was

immersed in 4% paraformaldehyde in PBS and embedded in paraplast. Tissue sections were cut and stained with haematoxylin and eosin to ensure that the removal of UEC from the remaining uterine tissue had been adequately performed (data not shown). UEC from each animal were passed through a 27-gauge needle using a 1-mL syringe and sonicated in a Vibra Cell sonicator (Sonic, Connecticut, USA) by 3 pulses of 30 s ON, 20 s OFF at 35% amplitude. Homogenates were centrifuged at 14000g for 20 min at 4 °C. Supernatant was recovered and stored at -70 °C until analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Protein extracts (30 µg) were heated at 94 °C for 5 min, separated by electrophoresis on a 13% or 8% SDS-PAGE and transferred to PVDF (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts) using a Mini Trans-Blot transfer system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Membranes were blocked for 30 min at room temperature with 5% nonfat dry milk. Membranes were then incubated overnight with the primary antibodies that recognized: ZO-1, claudins -1, -3, -4, -7, and GAPDH: (Cat No. 61-7300, 51-9000, 34-1700, 32-9400, 34-9100, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; sc-25778, Santa Cruz Biotechnologies, Inc, TX, USA). The same membrane was incubated with the antibody of interest and with anti GAPDH antibody, which was used as loading control. Subsequently, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Cat No. sc-2004, sc-2005, respectively, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 1 h (GAPDH) or overnight at room temperature. Signals were detected by chemiluminescence (Amersham Biosciences, Fairfield CT) in a C-Digit blot scanner (LI-COR, Inc, NE, USA). Results were expressed as a ratio of protein of interest/GAPDH to correct for loading for each uterine sample. Expression of each gene in the control group was normalized to 1. n = 3 for each GD and each treatment group.

2.5. Evaluation of serum hormonal levels

Serum P₄ levels were measured by specific double antibody radioimmunoassay, and serum E₂ was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). The analyses were done in independent serum samples from groups of five rats for each experimental condition. All samples were stored at -70 °C until needed, and determined as previously described [27,28]. The sensitivity of the assays was 9.714 pg/ml for E₂, 8.3 ng/ml for P₄. The intra- and inter-assay variation coefficients were 4.7% and 7.8%, respectively, for E₂, and 6.5% and 10% for P₄.

2.6. Statistical analysis

Radioimmunoassay data, ovulation rate, number of implantation sites and Western blots were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison test. Prism 2.01 program (Graph Pad, San Diego, CA) was used for calculating probability values.

3. Results

3.1. Treatment with BPA during pregnancy and lactation decreased E₂ and P₄ levels in the serum of rat F1 offspring

We studied the hormonal condition in F1 offspring of dams treated during pregnancy and lactation with BPA-L (0.05 mg/kg/day) or BPA-H (20 mg/kg/day), and in a control group, with vehicle only. We evaluated E₂ and P₄ serum levels, and found that, at GD 3, E₂ serum levels were lower in the BPA-L group in comparison to control animals (BPA-L: 16.40 ± 3.41 vs. C: 29.66 ± 1.90) (Fig. 1A), while P₄ serum levels decreased at GD 1 (C:

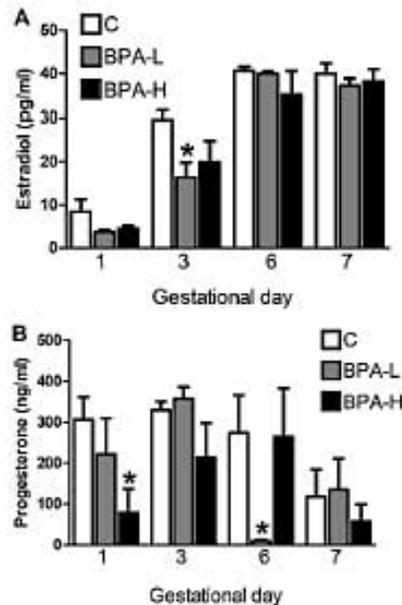


Fig. 1. BPA treated animals present differences in E_2 and P_4 serum levels as compared to controls. (A) E_2 serum levels were evaluated by ELISA and (B) P_4 by RIA in animals from the different groups. The graphs show the mean \pm SEM. $n=5$ animals per treatment per GD. Statistical analysis was done with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ as compared to the control group from the same GD. C, control; BPA-L, BPA low dose; BPA-H, BPA high dose.

307.0 ± 54.52 vs. BPA-H: 78.84 ± 58.05) and GD 6 (C: 274.2 ± 91.72 vs. BPA-L: 9.826 ± 3.355) in the BPA-H and BPA-L groups, respectively (Fig. 1B).

3.2. Treatment with BPA-H during pregnancy and lactation decreased the number of implantation sites in rat F1 offspring

Then we studied the number of implantation sites in the offspring of dams treated in the perinatal period with BPA-L, BPA-H or vehicle only, and observed that at GD 6 and 7 a significant decrease in the number of implantation sites was present in the BPA-H group in comparison to control animals (Fig. 2). This result suggested that the decrease in P_4 level observed at GD 1 in the group treated with BPA-H may contribute to the diminished implantation rate. In addition, we evaluated the ovulation rate at GD 1, and found no differences between the groups (data not shown). We also evaluated the ratio of female to male F1 offspring and found no differences between groups (data not shown).

3.3. The immunostaining of TJ proteins in the uterine epithelium changed during early pregnancy

Next we analyzed how the distribution of TJ proteins changed during early pregnancy in UEC of control rats (Table 1, Supplementary Fig. 1). We explored the distribution of ZO-1, since this molecule is present in all the TJs studied and is detected since the initial stages of TJs assembly. In control rats we observed that at GD 1, ZO-1 localized at the uppermost portion of the lateral membrane, at the region where TJ strands were expected to be formed. Interestingly, at GD 3 and 6 the distribution of ZO-1 changed, and the protein was detected along the basolateral membrane. At GD

7, ZO-1 was again concentrated at the limit between the apical and the lateral membrane, albeit in a lower amount (Supplementary Fig. 1, A–F).

Then we analyzed the distribution of claudins –1, –3, –4 and –7, because these proteins are expressed at the TJs of a wide variety of tissues, including the uterus, and their level of expression changes in response to diverse pathological and physiological conditions including for example, the estrous cycle [29]. We observed that in UEC, these claudins exhibited a basolateral distribution instead of being restricted to the uppermost portion of the lateral membrane (Supplementary Fig. 1, G–AD). We noted that the immunostaining of all studied claudins varied with time during pregnancy in control rats. Thus, claudins –1 and –3 showed a peak of immunostaining at GD 3 (Supplementary Fig. 1, H and N) while claudin-4 presented it at GD 6 (Supplementary Fig. 1U). On the other studied GDs the immunostaining of these claudins was lower. We also observed that the immunostaining of claudin-7 was lower at GD 6 and 7 (Supplementary Fig. 1 AA and AC) than at GD 1 and 3 (Supplementary Fig. 1 Y and Z).

Taken together, these observations indicated that as early pregnancy advances, the distribution of ZO-1 along the basolateral membrane as well as the degree of immunostaining of claudins –1, –3, –4 and –7 suffered significant changes.

3.4. The immunostaining of TJ proteins in the uterine epithelium varied between implantation and non-implantation sites in early pregnancy

We then explored if the immunostaining of TJ proteins in the uterus of control animals was the same at IS and NIS (Supplementary Fig. 1, Tables 1 and 2). We observed that at GD 6, which corresponds to the implantation day, claudin-4 was only localized at IS, while at NIS the immunostaining of ZO-1 and claudins-1 and –7 increased. In contrast, claudin-3 suffered no change. At GD 7, the immunostaining of claudins-1, –3 and –7 was lower at IS than at NIS. Since claudin-4 is a cation barrier [30] and claudin-7 a cation pore [31], these results suggested that at implantation day (GD 6) the transport of Na^+ through the TJ diminished in UEC, and that this change was related to implantation, since it only took place at IS.

3.5. The immunostaining of TJ proteins in the stromal cells of the uterus changed upon blastocyst penetration

It has been proposed that when the implanting embryo breaches the barrier of the UEC, a new temporary barrier is formed of TJs in the differentiated stromal cells of the primary decidua zone, in order to prevent the access of maternal immunoglobulins to the embryo [32,33]. This proposal prompted us to explore the immunostaining of TJ proteins in stromal cells of the uterus during early pregnancy (Supplementary Fig. 1). In control rats we observed that claudin-1 was present in stromal cells in all GD studied, and even at NIS (Supplementary Fig. 1 H–L). ZO-1 was detected in stromal cells until GD 6, however it was found in both IS and NIS (Supplementary Fig. 1 C–D). Instead, the striking feature was to observe that on GD 7, when the blastocyst penetrates the uterine epithelium and reaches the maternal stromal cells, claudins –3 and –4 were present in the cytoplasm of stromal cells at IS (Supplementary Fig. 1 Q and W) and not at NIS (Supplementary Fig. 1 R and X).

3.6. Treatment with BPA at the perinatal period changed the level of protein expression and distribution pattern of TJ proteins in the uterus of early pregnant rats of F1 generation

Next we studied if the administration of BPA-L or BPA-H during the perinatal period had an effect on the immunostaining and

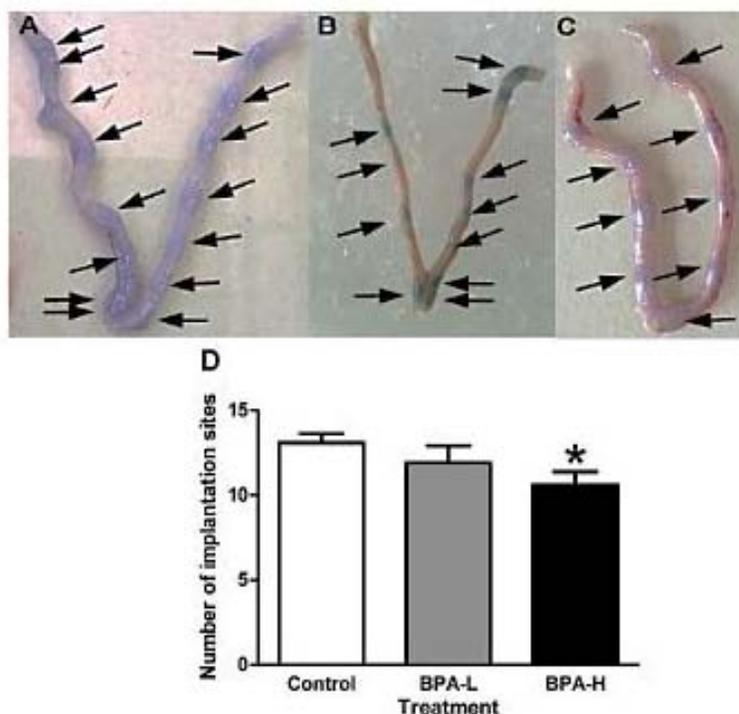


Fig. 2. BPA treatment decreases the number of implantation sites. The number of implantation sites was evaluated in the animals sacrificed on GD 6 or 7 in control (A), BPA-L (B) and BPA-H (C) groups, as described in materials and methods. Five animals were evaluated per group per GD. The graph (D) shows the mean \pm SEM of each treatment; both days of the treatment are grouped together. Statistical analysis was done with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ as compared to the control.

localization of ZO-1 and claudins -1, -3, -4 and -7 in the UEC of rats at GD 1, 3, 6 and 7 (Table 1, Figs. 3–7).

3.6.1. GD 1

At GD 1, ZO-1 immunostaining decreased in the BPA-L group in comparison to controls (Fig. 3B), while in the BPA-H group, ZO-1 presented an intermediate staining intensity and a punctuate distribution (Fig. 3C).

We also observed that the staining intensity of claudin-1 in comparison to the control group, increased with the amount of BPA administered (Fig. 3E and F), whereas that of claudin-3 diminished and almost disappeared (Fig. 3G–I). Claudin-4 was only detected in the BPA-L group (Fig. 3K), while exclusively in this group the intensity of claudin-7 diminished in comparison to control animals (Fig. 3N, arrowheads). Immunohistochemistry results were confirmed by Western blot, in which the same trends were observed: a significant decrease in claudin-3 expression in both BPA treated groups, and in claudin-7 in the BPA-L group, and a significant increase in claudin-4 in BPA-L, as compared to the control group (Fig. 4A, E).

In summary these results indicated that at GD 1 the low dose of BPA exerted the most significant effects: a decrease of ZO-1 and claudin-7 and an increase in claudin-4. BPA in a dose dependent manner increased claudin-1 protein expression and decreased that of claudin-3 (Table 1).

3.6.2. GD 3

During GD 3, in the BPA-L group, ZO-1 was almost undetectable (Fig. 5B), while the signal became more evident in the BPA-H group,

where it was mainly localized in the uppermost portion of the plasma membrane (Fig. 5C).

In the BPA-L group (Fig. 5E), the staining intensity of claudin-1 was reduced in comparison to control and BPA-H groups (Fig. 5F). Treatment with BPA at both low and high dose lowered the staining intensity of claudin-3 in a striking manner (Fig. 5H, and I). In contrast, both BPA treatments increased the immunostaining of claudin-4, which was not detected at GD 3 in control animals (Fig. 5J–L). This significant increase of claudin-4 in the BPA-L group was confirmed by Western blot (Fig. 4B, F). In the BPA-L group, the staining intensity of claudin-7 was lower than in control and BPA-H groups, resembling what was previously observed at GD 1 (Fig. 5M–O). Taken together, these results indicated that treatment with BPA at both low and high doses inhibited the increase in claudin-3 that normally occurs at GD 3. In addition, BPA-L decreased the immunostaining of claudins -1 and -7 and increased that of claudin-4, whereas BPA-H increased the immunostaining of claudin-4 (Table 1).

3.6.3. GD 5

ZO-1 at IS in the BPA-L group presented a more intense lateral staining pattern (Fig. 6B) than in the control tissue, while in the BPA-H group, ZO-1 concentrated at the uppermost region of the lateral membrane (Fig. 6C). At NIS, ZO-1 staining concentrated at the uppermost region of the lateral membrane in the control group (Supplementary Fig. 2A), and the same staining pattern was observed in BPA treated groups, albeit with a lower intensity (Supplementary Fig. 2B, and C).

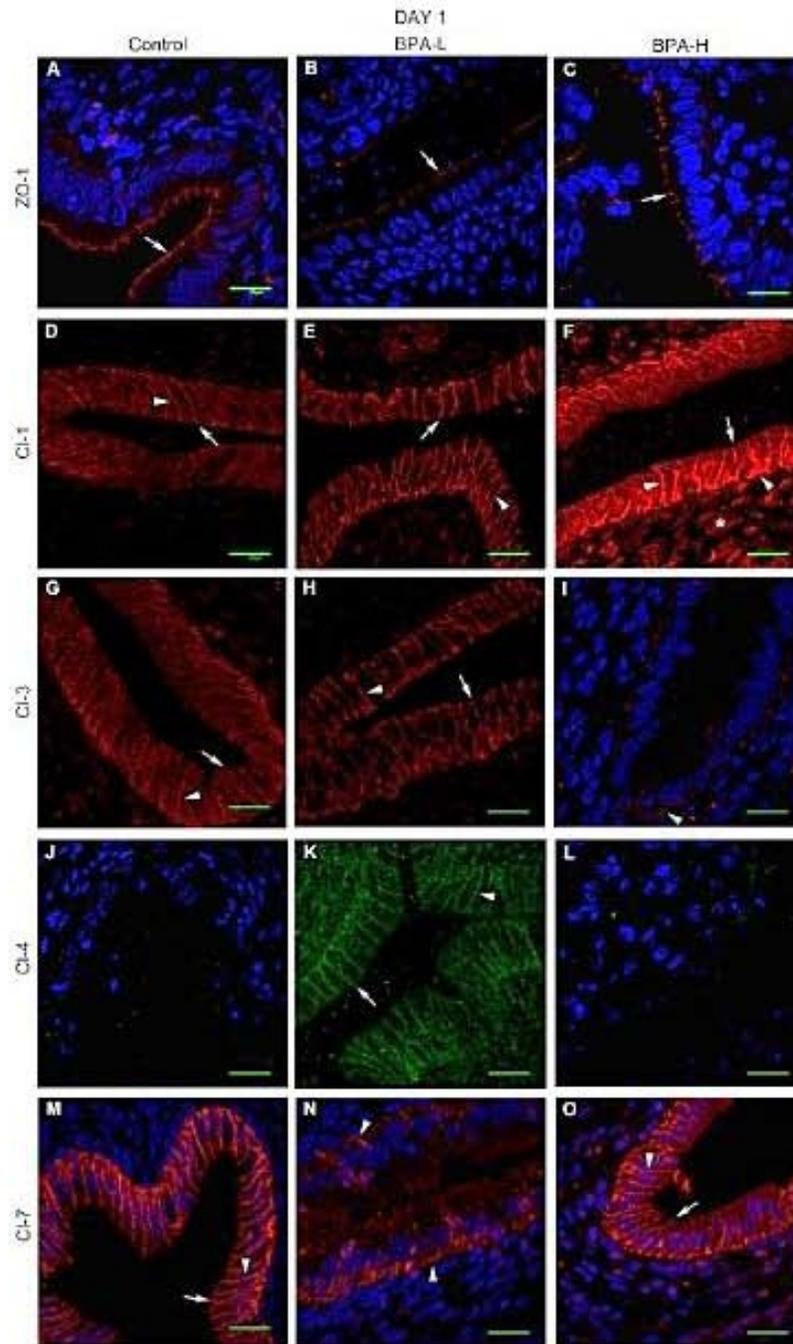


Fig. 3. TJ protein immunolocalization in UEC in control and BPA treated animals during GD 1. ZO-1 (A–C), claudin-1 (D–F), claudin-3 (G–I), claudin-4 (J–L), and claudin-7 (M–O) were immunolocalized in UEC during GD 1. Treatment group is specified at the top of each column: Control, control animals; BPA-L, BPA-low dose; BPA-H, BPA- high dose. Arrows indicate the localization of the protein in the uppermost part of lateral membrane in UEC, and arrowheads in the lateral membrane. Bar = 20 μ m. n = 5 animals per GD, per treatment. In panels A–C, I, J, L, and M–O, DAPI nuclear staining is also shown.

Table 1
Expression and localization of TJ proteins in UEC during early gestation.

	Control	BPA-L	BPA-H
GD 1			
ZO-1	+++ uppermost	+ uppermost	++ punctuate
Claudin-1	+ lateral	++ lateral	+++ basolateral
Claudin-3	+ lateral	+ lateral	+ basal
Claudin-4	---	+ basolateral	---
Claudin-7	+++ basolateral	+ lower half	+++ basolateral
GD 3			
ZO-1	+++ basolateral	+ punctuate	++ uppermost
Claudin-1	++ lateral	+ lateral	+++ lateral
Claudin-3	+++ lateral	+ lateral	++ lateral
Claudin-4	---	+ basolateral	+ basolateral
Claudin-7	+++ basolateral	+ lower half	+++ basolateral
GD 6 IS			
ZO-1	++ upper third	+++ upper third	+ uppermost
Claudin-1	++ lower half	++ lower half	+++ lower half
Claudin-3	+ lateral	+ lateral	+ lateral
Claudin-4	+ basolateral	++ basolateral	+ punctuate
Claudin-7	++ lower half	+ stroma cytoplasmic + basolateral	+ lower half
GD 7 IS			
ZO-1	+ punctuate	+ uppermost	+ punctuate
Claudin-1	---	---	++ lateral
Claudin-3	+ lateral	---	---
Claudin-4	++ stroma cytoplasmic	+ stroma cytoplasmic	---
Claudin-7	++ basolateral	+++ basal	+ stroma cytoplasmic ++ basolateral

Basal, basal portion of the membrane; Basolateral, basolateral portion of the membrane; Lateral, lateral portion of the membrane; lower half, lower half of the lateral membrane; Punctuate, punctuate at the uppermost portion of the lateral membrane; Uppermost, uppermost portion of the lateral membrane; upper third, upper third of the lateral portion of the membrane; stroma cytoplasmic, cytoplasmic staining of stromal cells. GD, gestational day; IS, implantation sites. --, no staining; +, low staining; ++ moderate staining; +++ intense staining.

At the IS on GD 6, treatment with BPA increased in a dose dependent manner the staining of claudin-1 in the lateral membrane and the cytoplasm (Fig. 6D–F). This result correlated with a significant increase in the amount of claudin-1 detected by Western blot in the BPA-H group in comparison to the control group (Fig. 4C, G). At the NIS, claudin-1 staining at the lateral membrane and cytoplasm increased in the BPA-L group in comparison to control and BPA-H groups (Supplementary Fig. 2 D–F).

During GD 6, claudin-3 staining at IS (Fig. 6G–I) and NIS (Supplementary Fig. 2 G–I) in UEC were barely detectable in the 3 studied groups.

During this GD, in the IS, claudin-4 was detected in the control group for the first time, where it could be detected in the basolateral membrane reaching the apex (Fig. 6J). The BPA-L group also expressed this protein in the baso-lateral membrane reaching the apex, in the IS (Fig. 6K). Interestingly, this group also presented immunostaining of claudin-4 in the cytoplasm of stromal cells (Fig. 6K asterisk). The BPA-H group only presented a very faint immunostaining of this protein in the apex of the UEC cells during this GD (Fig. 6L). This significant decrease was confirmed by Western-blot (Fig. 4C, G). In contrast, at the NIS, the control and the BPA-H group presented a very faint staining of claudin-4 at the lower half of the lateral plasma membrane, while the BPA-L group did not presented this protein (Supplementary Fig. 2 J–L).

At the IS, during GD 6, claudin-7 immunostaining was very low in the three studied groups (Fig. 6M–O), and could not be detected by Western blot. In contrast, at the NIS, the immunostaining of claudin-7 was high in the control group and diminished in the BPA treated groups (Supplementary Fig. 2 M–O).

In summary, at GD 6, treatment with BPA increased claudin-1 protein expression in a dose dependent manner at IS, and BPA at a high dose reduced claudin-4 protein expression at IS, while

the low dose reduced the protein expression of this claudin at NIS (Tables 1 and 2).

3.6.4. GD 7

At GD 7, treatment with the low dose of BPA increased ZO-1 signal in both IS (Fig. 7A–C) and NIS (Supplementary Fig. 3 A–C).

Also, treatment with BPA changed the immunostaining of claudin-1. Thus at IS a low dose of BPA provoked a diffuse cytoplasmic claudin-1 staining while a high dose increased the basolateral signal (Fig. 7D–F). The latter was also detected by Western blot (Fig. 4D, H), whereas at NIS, BPA-L and BPA-H increased claudin-1 staining (Supplementary Fig. 3 D–F). Treatment with BPA reduced the signal of claudin-3 at both IS (Fig. 7G–I, and Fig. 4D, H), and NIS (Supplementary Fig. 3 G–I).

At this GD, treatment with BPA exerted different effects on claudin-4 depending on the site studied. Thus, at IS, BPA decreased claudin-4 cytoplasmic signal in stromal cells in the BPA-H group and erased it in the BPA-L group (Fig. 7J–L), while at NIS, BPA increased the signal in a dose dependent fashion (Supplementary Fig. 3 J–L). Treatment with a low dose of BPA increased claudin-7 staining at IS (Fig. 7M–O), while at NIS, both low and high doses of BPA increased claudin-7 immunostaining (Supplementary Fig. 3M–O).

In summary, at GD 7, BPA-H increased claudin-1 protein expression at IS, and both treatments decreased claudins -3 and -4 protein expression. At NIS, BPA-L and BPA-H augmented claudins -1, -4 and -7 immunostaining and decreased claudin-3 staining (Tables 1 and 2).

Taken together, our results indicated that a perinatal treatment with BPA at low and high doses altered the expression of TJ proteins in UEC of early pregnant rats in various ways. Although in the BPA-L group the decrease in implantation sites was not significant, important variations in TJ proteins were observed, like the presence

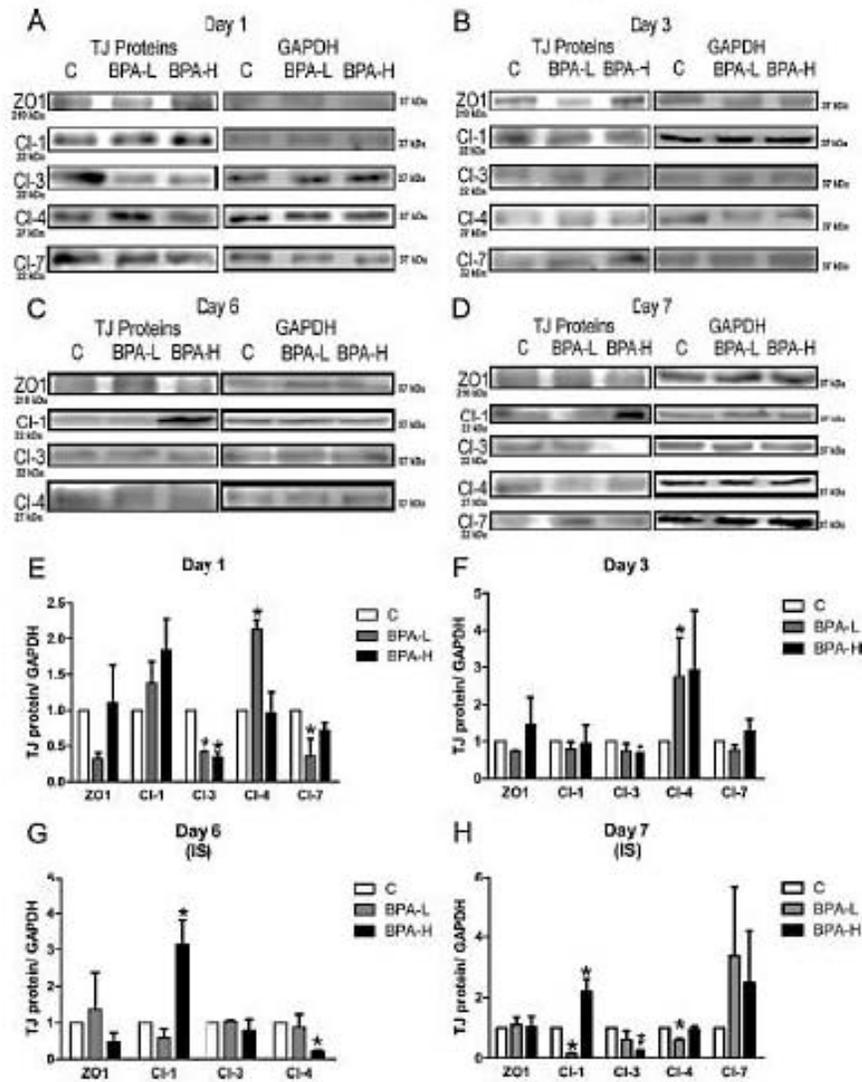


Fig. 4. TJ protein expression in UEC in control and BPA treated animals at GD 1 (A, E), 3 (B, F), 6 IS (C, G), and 7 IS (D, H) as determined by Western blot. A representative Western blot is shown of 3 independent experiments, with its corresponding GAPDH, employed as loading control for each lane. (E–H) All Western blots were evaluated by densitometric analysis. The expression of each protein of the control group was normalized to 1. Data represent the mean \pm SEM of 3 animals for each group, for each day. Statistical analysis was done with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$ as compared to the control.

of claudin-4 since GD 1. However, since the number of implantation sites decreased in rats that had received a perinatal BPA-H treatment, we analyzed in further detail the changes in TJ protein expression that happened with this treatment. We observed that BPA-H increased protein expression of claudin-1 in UEC at GD 6 and 7, whereas in control animals claudin-1 was maintained stable throughout early pregnancy. In addition, we found that the abrupt peaks of claudin-3 and -4 protein expression that were respectively observed in control animals at GD 3 and 6 were abolished by treatment with BPA-H. These observations hence suggest that BPA-H treatment in the perinatal period may exert its deleterious effect on fertility by changing the level of protein expression of claudins -1, -3 and -4 in the uterus of rats of F1 generation.

4. Discussion

In this work we have explored the impact of high and low doses of BPA given during pregnancy and lactation in the F1 offspring of dams. During the past several decades, infertility rates and early pregnancy loss have increased worldwide and currently affect 10–15% of couples in developed countries [34,35]. An important determinant of reduced fertility is a failed implantation, which is thought to account for 30–75% of preclinical pregnancy losses in humans [36]. This increase in infertility has correlated, among other factors, to exposure to endocrine disruptors, among which, BPA is one of the best studied. In humans, the percentage of patients with detectable BPA concentrations is significantly higher in the infertile patients compared with fertile subjects [16], and a positive

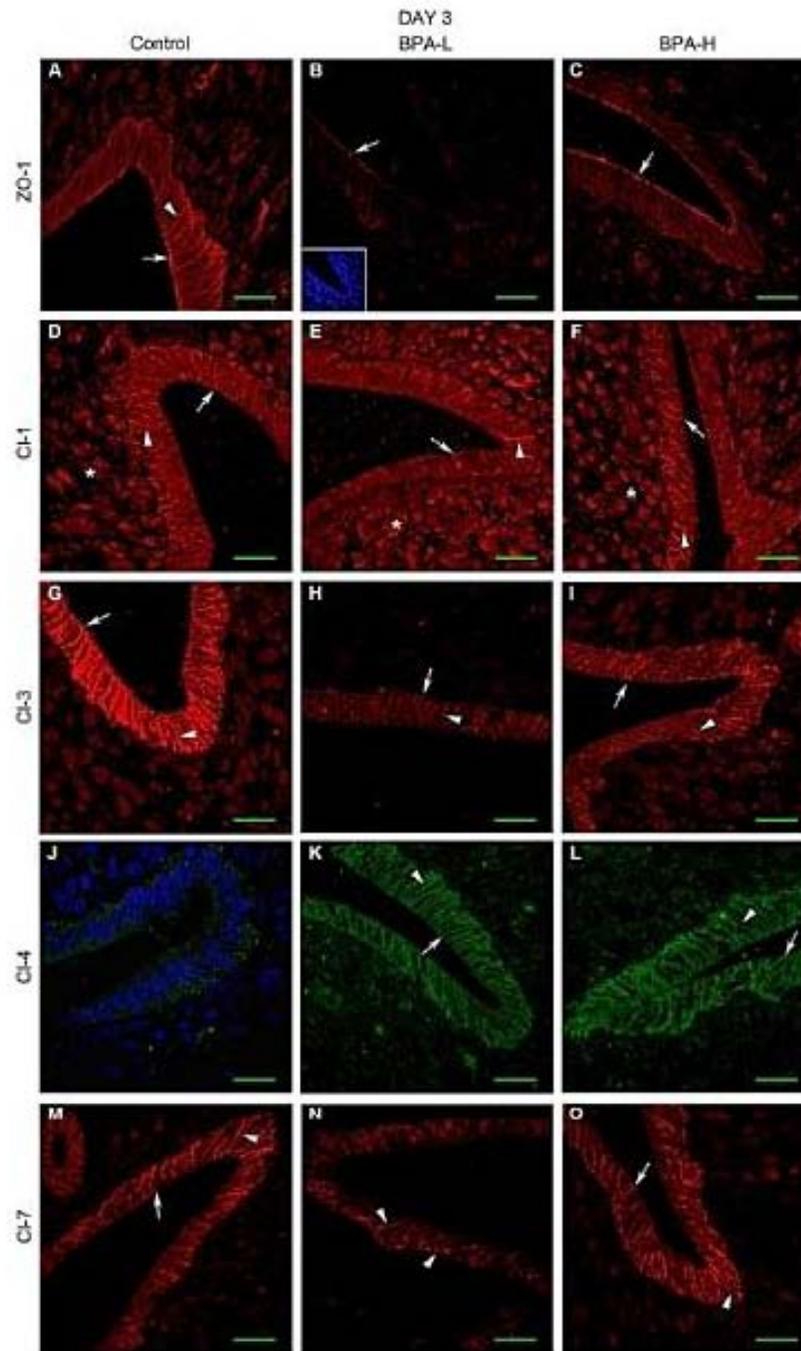


Fig. 5. TJ protein immunolocalization in UEC in control and BPA treated animals during GD 3. ZO-1 (A–C), claudin-1 (D–F), claudin-3 (G–I), claudin-4 (J–L), and claudin-7 (M–O) were immunolocalized in UEC during GD 3. Treatment group is specified at the top of each column: Control, control animals; BPA-L, BPA-low dose; BPA-H, BPA-high dose. Arrows indicate the localization of the protein in the uppermost part of lateral membrane in UEC, arrowheads in the lateral membrane, and the asterisk in the stromal cells. Bar = 20 μ m. n = 5 animals per GD, per treatment. In panel J, DAPI nuclear staining is also shown. B inset, DAPI nuclear staining.

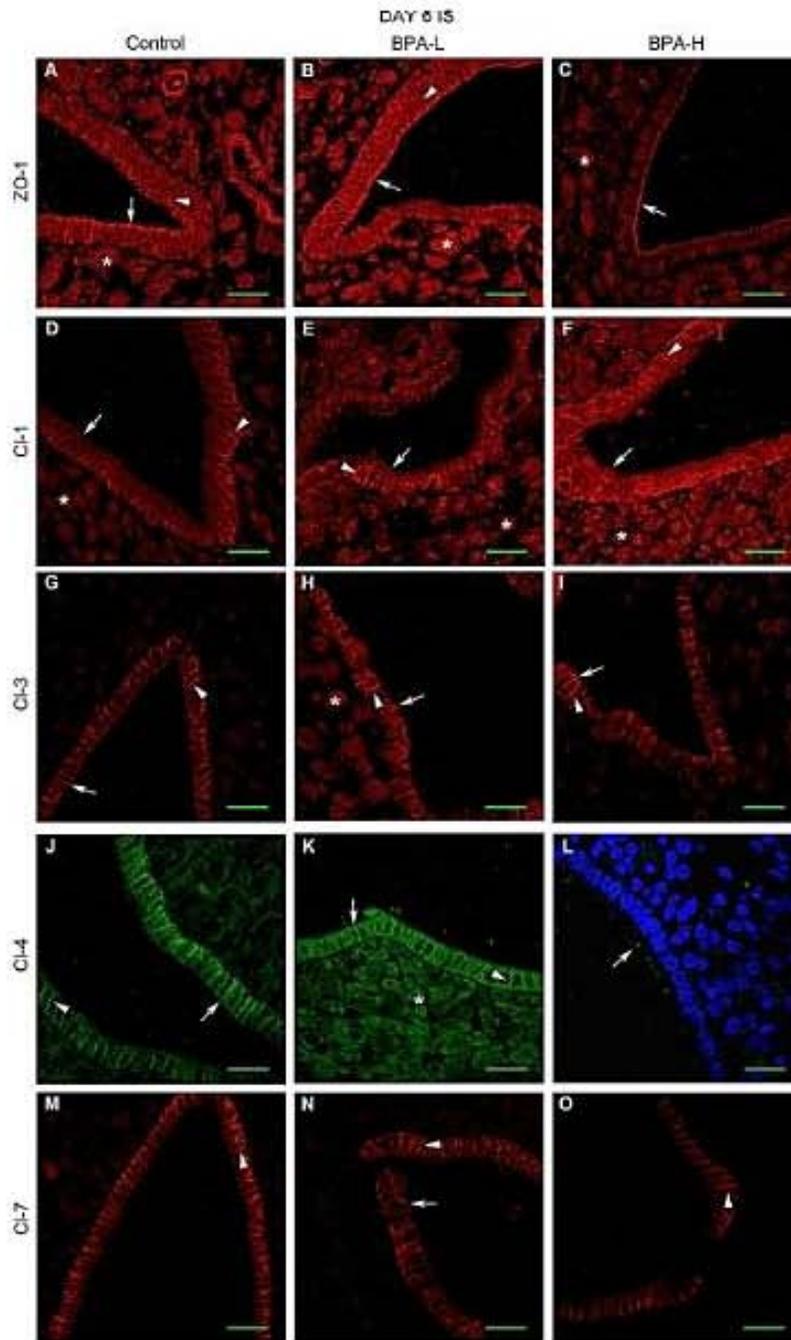


Fig. 6. TJ protein immunolocalization in UEC of the implantation sites in control and BPA treated animals during GD 6. ZO-1 (A–C), claudin-1 (D–F), claudin-3 (G–I), claudin-4 (J–L), and claudin-7 (M–O) were immunolocalized in UEC of the implantation sites during GD 6. Treatment group is specified at the top of each column: Control, control animals; BPA-L, BPA-low dose; BPA-H, BPA-high dose. Arrows indicate the localization of the protein in the uppermost part of lateral membrane in UEC, arrowheads in the lateral membrane, and the asterisk in the stromal cells. Bar = 20 μ m. n = 5 animals per GD, per treatment. In panel L, DAPI nuclear staining is also shown.

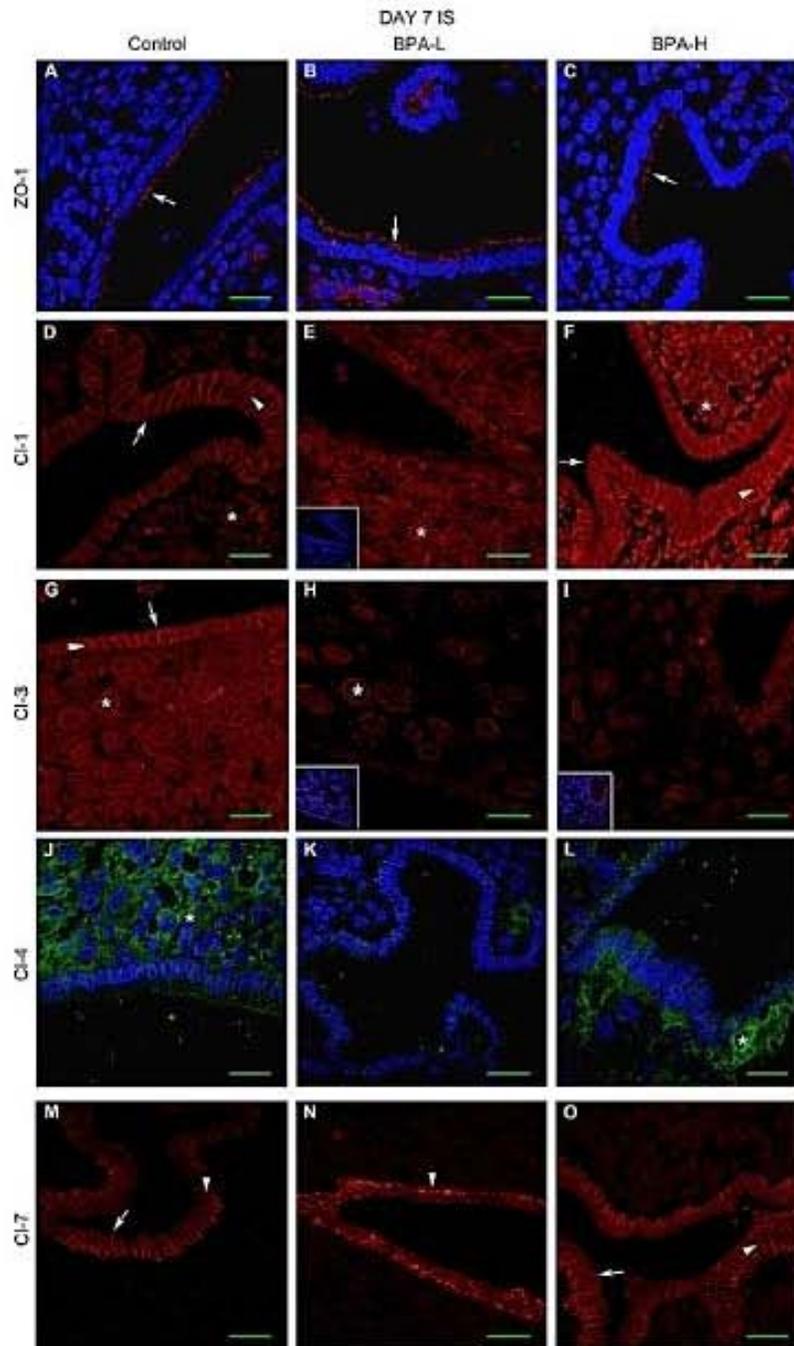


Fig. 7. TJ protein immunolocalization in UEC of the implantation sites in control and BPA treated animals during GD 7. ZO-1 (A–C), claudin-1 (D–F), claudin-3 (G–I), claudin-4 (J–L), and claudin-7 (M–O) were immunolocalized in UEC of the implantation sites during GD 7. Treatment group is specified at the top of each column: Control, control animals; BPA-L, BPA-low dose; BPA-H, BPA-high dose. Arrows indicate the localization of the protein in the uppermost part of lateral membrane in UEC, arrowheads in the lateral membrane, and the asterisk in the stromal cells. Bar = 20 μ m. n = 3 animals per GD, per treatment. In panels A–C, and J–L, DAPI nuclear staining is also shown. E, H, and I insets, DAPI nuclear staining.

Table 2
Expression and localization of TJ proteins in the non-implantation sites during GD 6 and 7.

	Control	BPA-L	BPA-H
Day 6 NIS			
ZO-1	+++ uppermost-lateral	+ uppermost-lateral	++ uppermost-lateral
Claudin-1	++ lower half	+++ lower half	+ lateral
Claudin-3	++ lateral	++ lateral	++ lateral
Claudin-4	+ lower half	—	+ lower half
Claudin-7	+++ basolateral	++ basolateral	+ basolateral
Day 7 NIS			
ZO-1	+ uppermost-lateral	+++ uppermost-lateral	++ uppermost-lateral
Claudin-1	++ lateral	+++ lateral	+++ lateral
Claudin-3	+++ lateral	++ lateral/	++ lateral
Claudin-4	—	+ stroma cytoplasmic + lower half	++ lower half
Claudin-7	++ basolateral	+++ basolateral	++ basolateral

Basolateral, basolateral portion of the membrane; Cytoplasm, cytoplasmic staining of UEC cells; Lateral, lateral portion of the membrane; lower half; lower half of the lateral membrane; Nuclear, nuclear staining of UEC cells; Uppermost, uppermost portion of the lateral membrane; stroma cytoplasmic, cytoplasmic staining of stromal cells.

—, no staining, +, low staining, ++ moderate staining, +++ intense staining.

linear dose-response association has been found between BPA urinary concentrations and implantation failure in *in vitro* fertilization studies [17].

In animal models, BPA exposure produces adverse effects in the female reproductive tissue and exposure to this compound during implantation and placentation periods decreased the number of fetus and pups, and the survival rate before weaning [7–14]. Nevertheless, the molecular mechanism employed by BPA to exert its adverse effects, remain largely unknown. To address this issue, here we have studied if TJ proteins of UEC constitute a target of BPA when the drug is administered during the perinatal period. We correlated these results with the number of implantation sites and the hormonal status of the animals.

We observed that although the ovulation rates were not affected by BPA treatment, the implantation rates decreased in the BPA-H group. To our knowledge, this is the first study to document the decrease in implantation sites in F1 generation exposed to BPA in utero and through their mothers' milk, since previous studies had only reported a reduced number of implantation sites, when BPA was directly administered to rodents (F0 dams) [37–42].

To investigate the mechanism through which BPA disrupts implantation, we studied the effect of perinatal BPA administration on the expression of TJ proteins in UEC during early pregnancy. TJs are involved in the transformation of the plasma membrane that makes UEC receptive to attachment by trophoblastic cells, and regulate the content and volume of the luminal fluid in the uterus. The latter has several roles, including maturation of the ovum and spermatozoa and provision of nutrients and signaling molecules for the implanting blastocyst [43].

The edema observed in the endometrium in rats during GD 1 [21,22,44], demands the movement of fluid from the stroma into the uterine lumen, through the paracellular pathway, which is guaranteed by the presence of leaky TJs formed by parallel strands that are localized at the uppermost portion of the plasma membrane [21,22]. Accordingly, during this GD, we found that ZO-1 was concentrated at the uppermost portion of the lateral membrane in the control group, and claudins –1 and –3 were present at a low level in the lateral membrane (Fig. 8A). Claudin-4 that functions as a cationic barrier [30] was absent, and claudin-7 that is involved in cell to extracellular matrix attachment [45] was highly expressed in the basolateral membrane (Fig. 8A). A similar expression pattern of TJ proteins in the uterus had been previously reported [18,23,43], although a difference is observed, since we detected claudins –1 and –3 distributed along the basolateral membrane, while these proteins were previously described concentrated at the limit between the apical and lateral membranes [18,23]. The parallel strands of TJs observed by freeze-fracture at GD 1 [21,22] could

be formed of claudin-1, since the exogenous expression of this claudin in L cell fibroblasts gives rise to linear, non-branching arrays of strands [46]. Finding that claudins –1 and –3 are present at this stage is in agreement with the observation that these claudins establish heterotypic interactions between themselves [47].

As pregnancy progressed, the network of TJ strands increased in depth. Accordingly, we observed during GD 3, that ZO-1 is now localized not only on the uppermost part of the plasma membrane of UEC in the control group, but all along the basolateral membrane. In addition the amount of claudins –1 and –3 increased (Fig. 8B).

By the time of implantation of the blastocyst at GD 6, which is defined as the irreversible adhesion of the blastocyst to the luminal epithelium, the TJ network increases 3-fold in depth along the lateral plasma membrane [21,22,48]. The TJs also exhibits more branches and interconnections with neighboring strands [21,22]. Accordingly, we observed in the control group that ZO-1 localized in the upper third of the lateral plasma membrane at IS in GD 6, claudin-1 in the lower half, claudin-3 in the lateral membrane and claudin-7 in the lower half. During this GD, claudin-4 was detected for the first time at the basolateral membrane of UEC (Fig. 8C). In humans, an increase in claudin-4 mRNA expression has been reported during the implantation window [49–51], and an increase in claudin-4 protein has been observed at GD 6 in rats [23], suggesting a functional role of this protein during implantation. Since claudin-4 overexpression in cultured cells increases the complexity of the network of TJ strands [30], our results suggest that at GD 6, claudin-4 augments the number of branches and interconnections with neighboring strands that have been observed by freeze-fracture [21,22]. In addition, we observed that at GD 6, in the IS, claudin-7 expression diminished and the localization changed from the basolateral distribution observed at GDs 1 and 3, to being displayed at the lower half of the basolateral membrane, in agreement with previous results [43]. Claudin-4 decreases paracellular Na⁺ permeability [30], while claudin-7 works as a paracellular Na⁺ channel and a Cl⁻ barrier [31]. Moreover, it is important to highlight that at the time of implantation, the transcellular epithelial Na⁺ channels (ENaC) are upregulated in rat UEC and are responsible for lowering the content of Na⁺ in the luminal fluid [52,53]. Therefore, the appearance at implantation day of ENaC and claudin-4, together with the disappearance of claudin-7 from the TJ region, guarantees the transcellular movement of Na⁺ from the apical to the basal surface of the epithelium without a back leak through the paracellular pathway. This vectorial transport of Na⁺, accompanied by the reabsorption of water from the luminal fluid through aquaporin 5 molecules [54,55], allows the blastocyst to come into close apposition with the luminal epithelium, and favors the contacts between these surfaces (Fig. 8C) [53,56,57]. Interestingly, the

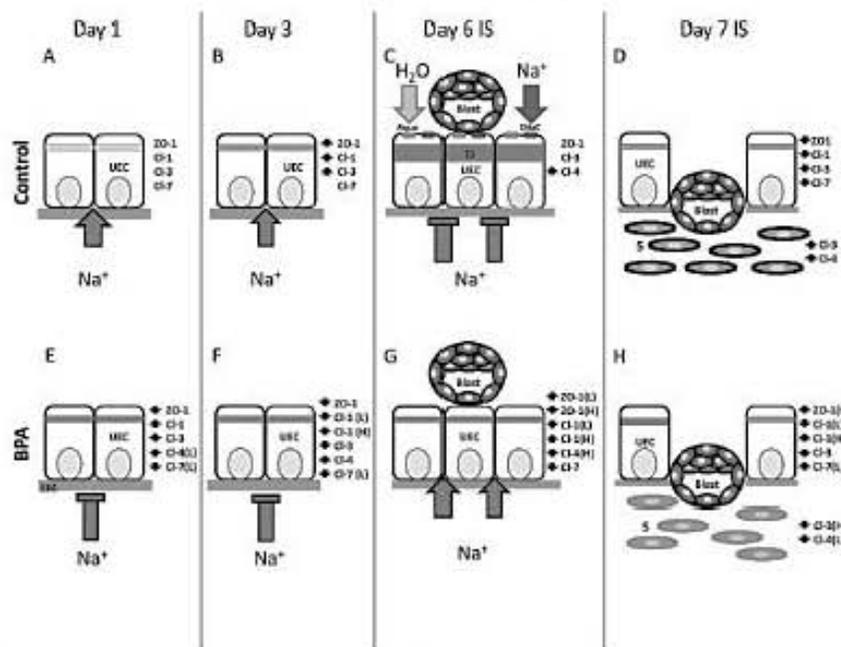


Fig. 8. Schematic diagram illustrating the structure of TJs in the rat UEC and stromal cells during early pregnancy. In the upper panels TJs of control animals are shown, while in the lower panels TJs of BPA treated animals are shown. In each panel the proteins present in the TJs are indicated besides it. A darker shading of the TJs indicate more branches and interconnections with neighboring strands, while a lighter shade indicate parallel strands. The size of the arrows of paracellular transport indicate the movement of fluids and ions from the stroma into the uterine lumen. In the BPA treated animals arrows beside the name of the protein indicates an increase (+), decrease (-), or no change (=) in protein expression as compared to the control animal in the respective GD. Aqua, aquaporin 3; Blast, blastocyst; C, claudin; EM, extracellular matrix; ENaC, epithelial Na^+ channels; S, stromal cells; TJ, tight junction; UEC, uterine epithelial cells.

peak of claudin-4 expression present at IS is absent at NIS, suggesting that the expression of claudin-4 is crucial for the implantation process.

The decreased expression of claudin-7, in the lower half of the lateral plasma membrane at GD 6, might contribute to diminish the cell to extracellular matrix adhesions that generate the loosely adhered epithelial monolayer that has been observed during implantation day [58–62]. It has been reported that claudin-7 forms a stable protein complex with claudin-1 and integrin $\alpha 2$, suggesting that the mechanism by which claudin-7 promotes cell–matrix adhesion is via stabilizing integrin $\alpha 2$ proteins which themselves are responsible for attachment to extracellular matrix components [45]. In contrast, in NIS, claudin-7 remained localized all along the basolateral membrane and with a high staining intensity, reinforcing the idea that the behavior of TJ proteins is different between IS and NIS.

At GD 7, at the time of blastocyst penetration through UEC into the stroma, the most interesting result is the appearance of claudins -3 and -4 in stromal cells (Fig. 8D). This observation is in line with others showing the presence of ZO-1, claudin-1 and occludin in the stromal cells of mouse uterus [32,33] and reinforces the idea of the formation of a barrier in stromal cells that might protect the blastocysts from maternal immunoglobulins.

Now with regards to BPA treatments, it was observed that the results of TJ protein expression and E_2 and P_4 serum levels did not follow a dose-response pattern. This type of behavior is common in endocrine disruptor studies, in which the disruptor does not exert traditional dose-response curves [1]. The mechanisms responsible for this behavior are related to the interactions between the ligand (hormone or endocrine disruptor) and a hormone receptor [1].

The most important change observed in the BPA treated animals was the presence of claudin-4 since GD 1 in the BPA-L group, and since GD 3 in the BPA-H group (Fig. 8E and F), whereas in the control group, claudin-4 is only expressed at a high level at GD 6. The premature appearance of claudin-4 may decrease in UEC the paracellular permeability of Na^+ and change in consequence the composition of the luminal fluid that in turn may obstruct the implantation process.

The increase of claudin-4 in BPA treated groups appears not to be due to hormonal changes since no changes were detected in P_4 and E_2 serum levels in the BPA-L group at GD 1 and only observed a decrease in E_2 serum level in the BPA-L group at GD 3. However, it is the increase and not the decrease of E_2 that has been shown by others to induce claudin-4 expression in UEC [23].

BPA also induced a change in the localization of ZO-1 during GD 3. Thus, in control UEC, ZO-1 protein expression was high along the basolateral membrane, while in BPA treated groups, ZO-1 protein expression was diminished and restricted to the uppermost part of the lateral membrane (Fig. 8F). Since ZO-1 works as a platform for the polymerization of claudins [63], these results suggest that treatment with BPA may impede the increase in depth that TJs has at GD 3 [21,22].

Claudin-7 is another protein that presented important changes between the BPA-L group and control rats. Claudin-7 localization along the basolateral membrane is present in a variety of epithelia, including the murine intestine and nephron, rat epididymis and rat uterus during the estrous cycle and pregnancy [29,43,45,64,65]. Accordingly, this protein was localized in the basolateral membrane of UEC during GD 1 and 3 in control and BPA-H groups, and

in the lower half of the lateral plasma membrane at IS, in GD 6 (Table 1).

In the BPA-L group, during GD 1 and 3, the expression of claudin-7 decreased in UEC, and the protein concentrated in the lower half of the lateral plasma membrane. This change correlated with an increase in claudin-4 protein expression, supporting the idea that BPA-L treatment favors the establishment of a cation impermeable TJ at GD 1 (Fig. 8E). In addition, since claudin-7 promotes cell–extracellular matrix adhesion [45], the decreased expression of this protein may suggest, an alteration in the maintenance of an intact uterine epithelial barrier during the non-receptive phase.

The decreased protein expression of claudin-7 present in BPA-L group during GD 3 could be related to the concomitant decrease in the level of E_2 in serum. However, we do not think that this is the case, since variations in the expression of claudin-7 induced by BPA at other time points, did not correlate with hormonal changes. In addition, we had previously observed that claudin-7 is expressed in UEC at diestrus, a stage of the estrous cycle where E_2 and P_4 levels are low [29].

Now, with regards to stromal cells, at GD 7, treatment with BPA-L induced the appearance of claudin-3 at NIS and the disappearance of claudin-4 from IS (Fig. 8H). Meanwhile, BPA-H treatment induced the disappearance of claudin-3 from IS (Fig. 8H). The absence of these claudins at the IS may impede the formation of the barrier among stromal cells that blocks the access of maternal immunoglobulins to the embryo.

5. Conclusion

In conclusion, the profound alterations in TJ proteins of UEC, due to perinatal exposure of BPA, leads to changes in fluid and ion transport across the epithelium that block the receptivity of the uterus to blastocyst implantation, when the animals reach adulthood and become pregnant.

Conflict of interest

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Funding

This work was supported by PAPIIT (IA202814 and IA209316) and PAIP (5000-9141) from the National Autonomous University of Mexico (UNAM) and by CONACYT (237241).

Acknowledgments

We thank MVZ Lucía Macías Rosales, MS Marisol Rivera Huerta and MS Alejandra Martínez Ibarra for their support in animal handling; PhD Karina Jiménez for her support in the processing of confocal microscope images; and Raquel del C Rodríguez Borges and Abril Morales Velázquez, for their support in the execution of some of the immunohistochemistry.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.02.009>.

References

- [1] E. Diamanti-Kandaraki, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 293–342.
- [2] J.H. Kang, F. Kondo, Y. Katayama, Human exposure to bisphenol A, *Toxicology* 226 (2006) 79–89.
- [3] R.R. Newbold, W.N. Jefferson, E. Padilla-Banks, Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 879–885.
- [4] C.A. Richter, L.S. Bimbaum, F. Farabolini, R.R. Newbold, B.S. Rubin, C.E. Talness, J.G. Vandenberg, D.E. Walsler-Kuntz, F.S. vom Saal, In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies, *Reprod. Toxicol.* 24 (2007) 199–224.
- [5] K. Uchida, A. Suzuki, Y. Kobayashi, D.L. Buchanan, T. Sato, H. Watanabe, Y. Katsu, J. Suzuki, K. Asaka, C. Mori, K. Arizono, T. Iguchi, Bisphenol-A administration during pregnancy results in fetal exposure in mice and monkeys, *J. Health Sci.* 48 (2002) 579–582.
- [6] H.S. Kim, S.Y. Han, S.D. Yoo, B.M. Lee, K.I. Park, Potential estrogenic effects of bisphenol-A estimated by *in vitro* and *in vivo* combination assays, *J. Toxicol. Sci.* 26 (2001) 111–118.
- [7] S. Honma, A. Suzuki, D.L. Buchanan, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Iguchi, Low dose effect of *in utero* exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction, *Reprod. Toxicol.* 16 (2002) 117–122.
- [8] K.L. Howdeshell, A.K. Hotchkiss, K.A. Thayer, J.G. Vandenberg, F.S. vom Saal, Exposure to bisphenol A advances puberty, *Nature* 401 (1999) 703–704.
- [9] C.M. Markey, M.A. Coombs, C. Sonnenschein, A.M. Soto, Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs, *Evol. Dev.* 5 (2003) 67–75.
- [10] C.A. Mendoza-Rodríguez, M. García-Guzmán, R. Baranda-Avila, S. Morimoto, M. Perrot-Appianat, M. Cerbón, Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring, *Reprod. Toxicol.* 31 (2011) 177–183.
- [11] B.S. Rubin, M.K. Murray, D.A. Damassa, J.C. King, A.M. Soto, Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 675–680.
- [12] G. Schönfelder, B. Flick, E. Mayr, C. Talness, M. Paul, I. Chahoud, *In utero* exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina, *Neoplasia* 4 (2002) 98–102.
- [13] G. Schönfelder, K. Friedrich, M. Paul, I. Chahoud, Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol A on the uterus of rat offspring, *Neoplasia* 6 (2004) 584–594.
- [14] T. Tachibana, Y. Wakimoto, N. Nakamura, T. Phichitrailip, S. Wakitani, K. Kusakabe, E. Honda, Y. Kiso, Effects of bisphenol A (BPA) on placental and survival of the neonates in mice, *J. Reprod. Dev.* 53 (2007) 509–514.
- [15] I. Souter, K.W. Smith, I. Dimitriadis, S. Ehrlich, P.L. Williams, A.M. Calafat, R. Hauser, The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments, *Reprod. Toxicol.* 42 (2013) 224–231.
- [16] D. Caserta, F. Clardo, G. Bordin, C. Guerranti, E. Fanella, G. Perra, F. Borghini, C. La Rocca, S. Tait, B. Bergamaschi, L. Stecca, R. Marri, G. Lo Monte, I. Soave, S. Focardi, A. Mantovani, M. Moscarini, Correlation of endocrine disrupting chemicals serum levels and white blood cells gene expression of nuclear receptors in a population of infertile women, *Int. J. Endocrinol.* 2013 (2013) 1–7.
- [17] S. Ehrlich, P.L. Williams, S.A. Missmer, J.A. Flaws, K.F. Berry, A.M. Calafat, R. Ye, J.C. Petruzzella, D. Wright, R. Hauser, Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing *in vitro* fertilization, *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 978–983.
- [18] M.D. Orchard, C.R. Murphy, Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat, *Acta Histochem.* 104 (2002) 149–155.
- [19] C.M. Van Itallie, J.M. Anderson, Architecture of tight junctions and principles of molecular composition, *Semin. Cell Dev. Biol.* 30 (2014) 157–165.
- [20] S. Tsukita, M. Furuse, M. Boh, Multifunctional strands in tight junctions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 285–293.
- [21] C.R. Murphy, J.G. Swift, T.M. Mukherjee, A.W. Rogers, Effects of ovarian hormones on cell membranes in the rat uterus. II. Freeze-fracture studies on tight junctions of the lateral plasma membrane of the luminal epithelium, *Cell Biophys.* 3 (1981) 57–69.
- [22] C.R. Murphy, J.G. Swift, T.M. Mukherjee, A.W. Rogers, The structure of tight junctions between uterine luminal epithelial cells at different stages of pregnancy in the rat, *Cell Tissue Res.* 223 (1982) 281–286.
- [23] M.D. Nicholson, L.A. Lindsay, C.R. Murphy, Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy, *Acta Histochem.* 112 (2010) 42–52.
- [24] R. Melnick, G. Lucier, M. Wolfe, R. Hall, G. Stancel, G. Prins, M. Gallo, K. Resul, S.M. Ho, T. Brown, J. Moore, J. Leakey, J. Haseman, M. Kohn, Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 427–431.
- [25] M.E. Cruz, A. Flores, B.E. Aylarado, C.G. Hernández, A. Zárate, R. Chavira, M. Cárdenas, I. Arrieta-Cruz, R. Gutiérrez-Juárez, Ovulation requires the activation of proestrous of M1 muscarinic receptors in the left ovary, *Endocrine* 49 (2015) 809–819.
- [26] C.A. Mendoza-Rodríguez, H. Merchant-Larios, I. Segura-Valdez Md Mde, N. Moreno-Mendoza, M.E. Cruz, P. Arteaga-López, I. Camacho-Arroyo, R. Domínguez, M. Cerbón, Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle, *Mol. Reprod. Dev.* 61 (2002) 445–452.
- [27] G.E. Abraham, Radioimmunoassays of steroids in biological fluids, *J. Steroid. Biochem.* 6 (1973) 261–270.

- [28] M. Olzanecka-Glimianowicz, P. Madej, D. Zdun, M. Bożentowicz-Wilkerek, J. Sikora, J. Chudek, P. Skaha, Are plasma levels of visfatin and retinol-binding protein 4 (RBP4) associated with body mass metabolic and hormonal disturbances in women with polycystic ovary syndrome? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 162 (2012) 53–61.
- [29] C.A. Mendoza-Rodríguez, L. González-Mariscal, M. Cerbón, Changes in the distribution of ZO-1 occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle, *Cell Tissue Res.* 319 (2005) 315–330.
- [30] C. Van Itallie, C. Rahner, M. Anderson, Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1319–1327.
- [31] M.D. Alexandre, Q. Lu, Y.H. Chen, Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 2083–2093.
- [32] B.C. Paria, X. Zhao, S.K. Das, S.K. Dey, K. Yoshinaga, Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization, *Dev. Biol.* 208 (1999) 488–501.
- [33] X. Wang, H. Matsumoto, X. Zhao, S.K. Das, B.C. Paria, Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 53–62.
- [34] J.A. Vite Vargas, D.A. Ortiz Núñez, I. Hernández Marín, J.M. Tovar Rodríguez, Ayala R.K. Epidemiological analysis of infertility in a Mexican population, *Ginecol. Obstet. Mex.* 73(2005) 300–304.
- [35] M.C. Inhorn, P. Patrício, Infertility around the globe: new thinking on gender: reproductive technologies and global movements in the 21st century, *Hum. Reprod. Update* 21 (2015) 411–426.
- [36] N.S. Macklon, J.P. Geraeets, B.C. Fauser, Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss, *Hum. Reprod. Update* 8 (2002) 333–343.
- [37] R.G. Berger, W.G. Foster, D. deCatanazaro, Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice, *Reprod. Toxicol.* 30 (2010) 393–400.
- [38] R.G. Berger, T. Hancock, D. deCatanazaro, Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice, *Reprod. Toxicol.* 23 (2007) 138–144.
- [39] R.G. Berger, J. Shaw, D. deCatanazaro, Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol, *Reprod. Toxicol.* 20 (2008) 94–99.
- [40] J. Varayoud, J.G. Ramos, V.L. Bosquiazzo, M. Lower, M. Muñoz-de-Torres, E.H. Luque, Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites, *Endocrinology* 152 (2011) 1101–1111.
- [41] S. Xian, H. Diao, M.A. Smith, X. Song, X. Ye, Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice, *Reprod. Toxicol.* 32 (2011) 434–441.
- [42] P.P. Yan, X.Y. Pan, H.H. Wang, Z.X. Li, X.N. Wang, Q. Lai, W.J. Song, H.Y. Zhao, Z.H. Dou, Effects of bisphenol-A on blastocyst development and implantation, *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 36 (2014) 331–336.
- [43] C.E. Poon, R.J. Madawala, M.L. Day, C.R. Murphy, Claudin 7 is reduced in uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat, *Histochem. Cell Biol.* 139 (2013) 583–593.
- [44] C.A. Finn, J.C. Bredt, The development of embryos in the uteri of mice treated with actinomycin D before implantation, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34 (1975) 429–434.
- [45] L. Ding, Z. Lu, D. Foreman, R. Tatum, Q. Lu, R. Renegar, J. Cao, Y.H. Chen, Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice, *Gastroenterology* 142 (2012) 305–313.
- [46] J. Ikenouchi, H. Sasaki, S. Tsukita, M. Furuse, S. Tsukita, Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin, *Mol. Biol. Cell* 19 (2008) 4087–4093.
- [47] C.M. Van Itallie, J.M. Anderson, Claudin interactions in and out of the tight junction, *Tissue Barriers* 1 (2013) e25247.
- [48] C.R. Murphy, The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy, *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 55 (2000) 23–28.
- [49] D.S. Carson, E. Largow, A. Thathiah, R. Al-Shami, M.C. Farach-Carson, M. Vernon, L. Yuan, M.A. Frit, B. Lessey, Changes in gene expression during early to mid luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high density microarray screening, *Mol. Human Reprod.* 8 (2002) 871–879.
- [50] L.C. Kao, S. Tulac, S. Lobo, B. Imani, J.P. Yang, A. Germeyer, K. Osteen, R.N. Taylor, B.A. Lessey, L.C. Giudice, Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation, *Endocrinology* 143 (2002) 2119–2138.
- [51] A. Siesewijk, J. Martin, R. van Os, J.A. Hoerajadas, J. Polman, A. Fellicer, S. Mosselman, C. Simon, Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology, *Mol. Hum. Reprod.* 9 (2003) 253–264.
- [52] L.L. Tsang, L.N. Chan, X.F. Wang, S.C. So, J.P. Yuen, R.R. Fiscus, H.C. Chan, Enhanced epithelial Na⁺ channel (ENaC) activity in mouse endometrial epithelium by upregulation of gammaENaC subunit, *Jpn. J. Physiol.* 51 (2001) 539–543.
- [53] N. Salleh, D.L. Baines, R.J. Naftalin, S.R. Milligan, The hormonal control of uterine luminal fluid secretion and absorption, *J. Membr. Biol.* 206 (2005) 17–28.
- [54] L.A. Lindsay, C.R. Murphy, Redistribution of aquaporins in uterine epithelial cells at the time of implantation in the rat, *Acta Histochem.* 106 (2004) 299–307.
- [55] L.A. Lindsay, C.R. Murphy, Redistribution of aquaporins 1 and 5 in the rat uterus is dependent on progesterone: a study with light and electron microscopy, *Reproduction* 131 (2006) 369–378.
- [56] A. Enders, S. Schlaife, A morphological analysis of the early implantation stages in the rat, *Am. J. Anat.* 120 (1907) 185–223.
- [57] F.Y. Png, C.R. Murphy, Closure of the uterine lumen and the plasma membrane transformation do not require blastocyst implantation, *Eur. J. Morphol.* 38 (2000) 122–127.
- [58] I.M. Illingworth, I. Kizuka, S. Bagley, G.W. Ireland, D.R. Garrod, S.J. Kimber, Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation, *Biol. Reprod.* 63 (2000) 1764–1773.
- [59] Y. Kaneko, L. Lecce, C.R. Murphy, Ovarian hormones regulate expression of the focal adhesion proteins talin and paxillin, in rat uterine luminal but not glandular epithelial cells, *Histochem. Cell Biol.* 132 (2009) 613–622.
- [60] Y. Kaneko, L.A. Lindsay, C.R. Murphy, Focal adhesions disassemble during early pregnancy in rat uterine epithelial cells, *Reprod. Fertil. Dev.* 20 (2008) 892–899.
- [61] A.M. Preston, L.A. Lindsay, C.R. Murphy, Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: an ultrastructural and morphometric study, *J. Microscop.* 267 (2000) 103–108.
- [62] H. Tinel, H.W. Denker, M. Thie, Calcium influx in human uterine epithelial RL92-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signalling events during embryo implantation, *Mol. Hum. Reprod.* 6 (2000) 1119–1130.
- [63] K. Umeda, J. Ikenouchi, S. Katshira-Tayama, K. Furuse, H. Sasaki, M. Nakayama, T. Matsui, S. Tsukita, M. Furuse, S. Tsukita, ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation, *Cell* 120 (2000) 741–754.
- [64] S. Amasheh, M. Fromm, D. Günzel, Claudins of intestine and nephron – a correlation of molecular tight junction structure and barrier function, *Acta Physiol. (Oxf.)* 201 (2011) 133–140.
- [65] L. González-Mariscal, M. Ramorad, C. del, D. Martín, G. Sierra, J.L. Reyes, The tight junction protein claudin-7 and -8 display a different subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney, *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (2006) 2391–2398.