



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Efecto del disruptor endócrino bisfenol-A sobre la implantación. Estudio de proteínas de adhesión y uniones estrechas en útero y blastocisto de rata.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q. A. Annia Alejandra Martínez Peña

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Elena Ibarra Rubio
Facultad de Química

Dra. María Isabel Hernández Ochoa
Departamento de Toxicología, CINVESTAV

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero, 2018



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.

Índice

1) Resumen	1
2) Introducción	2
3) Antecedentes	4
3.1 Generalidades del BPA	4
3.2 Exposición del ser humano al BPA	5
3.3 Efectos adversos del BPA sobre la fertilidad	9
3.3.1 Efectos en humanos	9
3.3.2 Efectos en animales de experimentación.....	11
3.4 Proteínas de adhesión.....	16
3.4.1 Integrina $\beta 3$	18
3.4.1.1 Papel de integrinas durante la gestación.....	18
3.4.1.2 Efecto del BPA sobre la expresión de integrina $\beta 3$	20
3.4.1.3 Interacción de integrinas con otras proteínas de adhesiones focales.....	21
3.4.2 Talina.....	22
3.4.2.1 Expresión de talina en el útero de rata durante la gestación temprana.....	25
3.4.3 Paxilina.....	25
3.4.3.1 Expresión de paxilina en el útero de rata durante la gestación temprana.....	27
3.4.4 E-cadherina.....	27
3.4.4.1 Papel de E-cadherina en el útero y blastocisto de rata durante la gestación temprana.....	28
3.4.4.2 Efecto del BPA sobre la expresión de E-cadherina....	30
3.5 Uniones estrechas.....	30
3.5.1 Uniones estrechas en el útero de rata durante la gestación temprana.....	31
3.5.2 Ocludina.....	32

3.5.2.1	Expresión de ocludina en el útero de rata durante la gestación temprana.....	33
3.5.2.2	Efecto del BPA sobre la expresión de ocludina.....	34
4)	Planteamiento del problema.....	36
5)	Hipótesis.....	37
6)	Objetivo general.....	38
6.1	Objetivos particulares.....	38
7)	Metodología.....	39
7.1	Animales de experimentación.....	39
7.2	Monitoreo del ciclo estral y apareamiento.....	39
7.3	Tratamiento farmacológico de la generación F0.....	41
7.4	Caracterización fenotípica de la generación F1.....	42
7.5	Evaluación de parámetros reproductivos (F1).....	42
7.6	Obtención de blastocistos (F2).....	43
7.7	Procesamiento de los tejidos.....	44
7.8	Estudio de los niveles de proteína.....	45
7.8.1	Ensayo de Inmunofluorescencia.....	45
7.8.1.1	Cortes en congelación.....	45
7.8.1.2	Cortes en parafina.....	46
7.8.1.3	Blastocistos.....	47
7.8.2	Ensayo de inmunohistoquímica revelado con diaminobencidina (DAB).....	48
7.8.3	Extracción de proteína y Western Blot.....	48
7.9	Análisis de los datos.....	50
8)	Resultados.....	51
8.1	Días de gestación y número de crías de la generación F0.....	51
8.2	Aumento de la DAG al día del destete de la generación F1.....	51
8.3	Alteración de parámetros reproductivos de F1.....	52
8.3.1	Irregularidad del ciclo estral de las hembras F1.....	52
8.3.2	Disminución del número de sitios de implantación.....	52

8.4 Alteración de niveles y distribución de proteínas en el epitelio luminal uterino.....	54
8.4.1 Integrina $\beta 3$	54
8.4.2 Talina.....	54
8.4.3 Paxilina.....	58
8.4.4 E-cadherina.....	60
8.4.5 Ocludina.....	64
8.5 Disminución de E-cadherina en el blastocisto.....	68
9) Discusión.....	71
10) Conclusiones.....	91
11) Perspectivas.....	91
12) Referencias.....	93

Abreviaturas

BPA: Bisfenol-A.

CELU: Células del epitelio luminal uterino.

DAG: Distancia anogenital.

DG: Día de gestación.

E₂: Estradiol.

F0: Generación que recibió directamente el tratamiento.

F1: Generación que recibió el tratamiento a través de sus madres.

F2: Generación (blastocistos) obtenida a partir de la generación F1.

IDA: Ingesta diaria admisible.

NOAEL: “No observed adverse effect level” o dosis máxima sin efecto adverso.

PC: Peso corporal.

P₄: Progesterona.

PR: Receptor a progesterona.

1. Resumen

Debido a la creciente exposición del ser humano a diversos disruptores endócrinos como el bisfenol-A (BPA), se han realizado múltiples estudios con el fin de conocer los efectos adversos de estos compuestos sobre el organismo y la salud reproductiva, así como los mecanismos moleculares a través de los cuales actúan. En el presente proyecto, se administró BPA (0.05 mg/kg de peso corporal/día) a ratas de la cepa Wistar preñadas (F0), durante la gestación y lactancia, y se evaluaron algunos parámetros reproductivos (regularidad del ciclo estral y número de sitios de implantación) de sus crías (F1) con el fin de conocer si el tratamiento perinatal con BPA tuvo un impacto sobre la fertilidad de los animales en la etapa adulta.

Se observó en el grupo tratado con BPA, al día del destete, un aumento en la distancia anogenital de las crías F1 (parámetro indicativo del desarrollo sexual) así como un mayor porcentaje de hembras con ciclo estral irregular al alcanzar la madurez sexual.

Al aparear a los animales F1, se formaron cuatro grupos experimentales: hembra control-macho control (♀C-♂C), hembra tratada-macho control (♀B-♂C), hembra control-macho tratado (♀C-♂B) y hembra tratada-macho tratado (♀B-♂B). Se observó una disminución en el número de sitios de implantación en los tres grupos tratados con respecto al control, siendo esta diferencia más notable en el grupo ♀C-♂B y aún mayor en el grupo ♀B-♂B . Al estudiar estos sitios de implantación, se observaron alteraciones en los niveles y la localización de dos proteínas de adhesiones focales (talina y paxilina), una de uniones adherentes (E-cadherina) y una de uniones estrechas (occludina) en el epitelio luminal uterino. Además, se observó una disminución en los niveles de E-cadherina en los blastocistos generados por machos tratados, siendo esta mayor en el grupo ♀B-♂B .

Los resultados sugieren que la exposición perinatal a BPA afecta el desarrollo y la homeostasis de los sistemas endócrino y reproductivo, generando alteraciones fisiológicas al llegar la madurez sexual. Estas alteraciones resultaron en una fertilidad reducida de ambos padres, por lo que además fue posible observar un efecto aditivo.

2. Introducción

El bisfenol-A es un compuesto orgánico actualmente utilizado en la producción de materiales que a su vez son usados en la elaboración de curaciones dentales, biberones y empaques alimentarios en general.

La importancia de este compuesto en la vida cotidiana reside en dos factores. El primero se basa en los trabajos de Vom Saal *et al.* (1998) y Yamamoto *et al.* (1999) que demuestran que el BPA tiene la capacidad de migrar desde el polímero hacia el alimento, lo que implica una exposición del ser humano por vía oral al compuesto a través de estos empaques y curaciones.

El segundo factor que sustenta la importancia del estudio de los efectos del BPA se relaciona con su actividad como disruptor endócrino en el cuerpo humano. De acuerdo con la EPA (Environmental Protection Agency), los disruptores endócrinos son agentes exógenos al organismo que tienen la capacidad de interferir con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, acción vinculante o eliminación de hormonas naturales acarreadas por la sangre responsables de procesos de homeostasis, reproducción y desarrollo.

De igual manera, hay estudios que mencionan que el BPA se transmite a través de la leche materna (Tsutsumi, 2005; Ye *et al.*, 2006), la placenta (Schonfelder *et al.*, 2002a) y el cordón umbilical (Todaka & Mori, 2002), por lo que los fetos y neonatos están expuestos a este compuesto sin necesidad de consumirlo directamente. Otras investigaciones demuestran que es justamente en etapas tempranas del desarrollo en las que los humanos son más sensibles a los efectos del BPA, teniendo consecuencias irreversibles a largo plazo (Richter *et al.* 2007a).

En cuanto a la función reproductiva, se ha observado una relación entre el BPA y la infertilidad en mujeres, así como la falla de implantación (Caserta *et al.*, 2013; Ehrlich *et al.*, 2012). En hombres se ha asociado con una disminución en parámetros de calidad de semen como una menor concentración, motilidad, velocidad y vitalidad de espermatozoides (Meeker *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Lassen *et al.*, 2014). Estudios en roedores han sido congruentes con esta

información y además han demostrado efectos transgeneracionales por la exposición al compuesto, así como alteraciones en la expresión de proteínas de adhesión y de uniones estrechas (Cabaton *et al.*, 2011; Berger *et al.*, 2008; Tachibana *et al.*, 2007; Salian *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2015; Varayoud *et al.*, 2011; Borman *et al.*, 2015; Martínez-Peña *et al.*, 2017).

Debido a que con los años y la creciente producción de alimentos empacados se ha incrementado la exposición del ser humano al BPA, es de suma relevancia investigar con más detalle los efectos que tiene este compuesto sobre el organismo y los mecanismos moleculares a través de los cuales actúa.

En el presente proyecto se estudiaron los efectos del BPA sobre la funcionalidad reproductiva de las crías de ratas Wistar al haber administrado el compuesto a la madre durante la gestación y la lactancia. Se evaluaron diversos parámetros reproductivos, así como el efecto sobre tres proteínas de adhesión y una de uniones estrechas en el epitelio luminal uterino y una de adhesión en el blastocisto de cuatro grupos experimentales: hembra control-macho control (♀C-♂C), hembra tratada-macho control (♀B-♂C), hembra control-macho tratado (♀C-♂B) y hembra tratada-macho tratado (♀B-♂B), con el fin de observar el efecto sobre la gestación de un solo padre tratado y ambos padres tratados.

3. Antecedentes

3.1 Generalidades del BPA

El 2,2'-bis(4-hidroxifenil) propano, comúnmente nombrado bisfenol-A (Figura 1) debido a su obtención a partir de dos moléculas de fenol y una de acetona, es actualmente utilizado en la producción de epóxidos, poliestireno y resinas de policarbonato que, a su vez, son empleados en la elaboración de curaciones dentales, biberones, recubrimientos internos de latas para alimentos, botellas para bebidas y empaques alimentarios en general.

A pesar de no estar presente en la naturaleza, es posible encontrar BPA en diversas fuentes a las que gran parte de la población está expuesta, ya que el estilo de vida actual demanda que los alimentos y las bebidas se encuentren en presentaciones prácticas y fáciles de consumir que por lo general son empacadas o enlatadas y por tanto están en contacto directo con este disruptor endócrino.

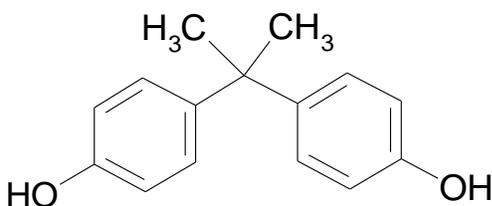


Figura 1. Bisfenol A (BPA).

Como ya se ha mencionado, el BPA tiene la capacidad de migrar de los polímeros hacia el alimento contenido en el empaque y esta capacidad de migración aumenta con la exposición a altas temperaturas y con el uso constante del producto (Takao *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.* 1999; Yoshida *et al.*, 2001). Se ha comprobado la migración de BPA desde el polímero hasta el alimento con métodos como HPLC, detección UV, cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-SM), así como cromatografía de líquidos – espectrometría de masas (CL-SM). Con dichas técnicas se observó que al evaluar la migración de BPA en agua, vinagre y aceite de oliva por 10 días a 40°C, esta fue mayor en aceite de oliva, debido a su naturaleza apolar. Sin embargo, en todos los casos los valores

han sido menores a los establecidos como migración límite de BPA en la Unión Europea (López-Cervantes *et al.*, 2003).

3.2 Exposición del ser humano al BPA

La ingesta diaria admisible (IDA) corresponde a la cantidad de un compuesto químico a la que una persona puede estar expuesta diariamente por un periodo de tiempo extendido (por lo general toda la vida) sin sufrir efectos adversos. También es llamada por las Agencias Regulatorias Estadounidenses como Dosis de Referencia. Actualmente, la Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA) y la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos, tienen registrada una IDA para el BPA de 0.05 mg/kg de pc al día. El conocimiento y las regulaciones actuales mencionan que no debería observarse un efecto adverso con esta dosis, sin embargo se ha llegado a cuestionar este dato y la manera de calcularlo, principalmente bajo el argumento de que los disruptores endócrinos no siempre tienen un efecto dosis-respuesta que es el principio bajo el cual se calcula el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) y a su vez la IDA de un compuesto (Miyawaki *et al.*, 2007; Vandenberg *et al.*, 2012; Vandenberg, 2014). Además, se han observado efectos a dosis equivalentes y más bajas (Kyong *et al.*, 2012; Cabaton *et al.*, 2011; Salian *et al.*, 2009b).

Se producen anualmente alrededor de 6 millones de toneladas de BPA y, debido a un aumento en el uso de productos elaborados con resinas epóxicas y de policarbonato, se ha incrementado la exposición humana al BPA. De hecho, es el principal compuesto estrogénico que se fuga a las fuentes de agua y alimento (Vom Saal *et al.*, 2007).

Estudios en Holanda, Alemania, China, Japón y Noruega han encontrado una extendida exposición de la población al BPA en cada uno de estos países (Becker *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Yamano *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2008 y 2009). En México, se realizó un estudio con 60 mujeres; en 80.0% (N = 48) de ellas se detectó BPA en orina en un intervalo de concentración de 0.4 ng/mL a 6.7 ng/mL (Cantonwine *et al.*, 2010). Otro estudio analizó muestras de agua superficial y

subterránea de la Ciudad de México, encontrando niveles de BPA similares pero ligeramente inferiores que los reportados en algunos países desarrollados (Félix-Cañedo *et al.* 2013). De igual manera, existe un estudio en el que se determinó la concentración total de BPA en muestras de orina de 108 niños mexicanos de entre 8 y 13 años y de las madres de 99 de esos niños durante su tercer trimestre de embarazo. Se detectó BPA en casi el 40% de las muestras de las madres y casi el 50% de los niños y niñas (Lewis *et al.* 2013).

El Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos estimó que casi todos los estadounidenses (93%) tienen niveles detectables (≥ 0.1 ng/mL) de BPA en el organismo y que los niños tienen niveles más altos que los adultos, lo que indica que la exposición ambiental es amplia (Calafat *et al.*, 2005 y 2008). Además de la exposición humana al BPA debido al ambiente (acuático, aire y suelo), actualmente se sabe que la principal vía de contacto son los alimentos (López-Cervantes *et al.*, 2003). Muchos estudios sugieren que los altos niveles de BPA en orina podrían estar correlacionados con el consumo de alimentos enlatados (Inoue *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Rudel *et al.*, 2011). Un estudio de Geens *et al.* (2010) evaluó muestras de elote, zanahoria, anchoa y puré de manzana en lata y en envase de cristal de la misma marca. Se encontró un promedio de 24.1 ng de BPA/g de elote en lata, 0.9 ng/g de elote en cristal, 32.4 ng/g de zanahoria en lata, 0.5 ng/g de zanahoria en cristal, 0.9 ng/g de anchoa en lata, 0.7 ng/g de anchoa en cristal, 0.2 ng/g de puré de manzana en lata y 0.3 ng/g de puré de manzana en cristal. Puede observarse que, a excepción del puré de manzana, todas las concentraciones promedio de BPA halladas en los alimentos fueron mayores en su presentación enlatada que en envase de cristal, lo que pone de manifiesto la contribución del empaque en la concentración del compuesto en el alimento.

Además de la exposición al BPA en etapa adulta, el ser humano está expuesto a este compuesto desde las primeras etapas de gestación, ya que se han detectado niveles de BPA en la sangre del cordón umbilical, en plasma materno y fetal, en fluido amniótico y en tejido placentario, lo que indica que el BPA no se une a la

alfafetoproteína que secuestra a los estrógenos y es capaz de cruzar la barrera placentaria (Ikezuki *et al.*, 2002; Padmanabhan *et al.*, 2008; Schonfelder *et al.*, 2002a; Vandenberg *et al.*, 2007, Todaka & Mori, 2002). Existen estudios que demuestran que los neonatos también pueden estar expuestos al BPA al transmitirse por medio de la leche materna (Tsutsumi, 2005; Ye *et al.*, 2006). De igual manera, los neonatos en unidades de cuidados intensivos pueden tener una mayor exposición al BPA debido al uso de aditamentos médicos (Calafat *et al.*, 2009).

Ya que se ha demostrado que los efectos del BPA tienen un mayor impacto en las etapas tempranas del desarrollo que en la etapa adulta (Richter *et al.*, 2007a), la exposición durante la gestación y lactancia es de particular interés.

Uno de los principales debates con respecto a estos efectos más relevantes en fetos y neonatos es la manera en que se metaboliza el BPA dentro del organismo, puesto que a pesar de que es claro que existen diferencias entre organismos adultos y organismos en desarrollo, así como entre roedores y humanos, no se ha llegado a conclusiones claras con respecto a qué tanto impacto tienen estas diferencias metabólicas sobre el efecto del BPA.

La información recolectada hasta el momento indica que el metabolismo del BPA en los mamíferos es principalmente a través de dos vías: la glucuronidación y la sulfatación. La primera se lleva a cabo en los microsomas hepáticos por medio de la acción de las UDP-glucuronosiltransferasas (UGT) (Yokota *et al.*, 1999) y la segunda por medio de las sulfotransferasas (Suiko *et al.*, 2000; Nishiyama *et al.*, 2002). Estos productos conjugados prácticamente carecen de actividad estrogénica y se eliminan en poco tiempo del organismo a través de la orina y las heces (Upmeier *et al.*, 2000; Pottenger *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2000; Völkel *et al.*, 2002; Völkel *et al.*, 2005; Kurebayashi *et al.*, 2002; Kurebayashi *et al.*, 2005; Doerge *et al.*, 2010). Sin embargo, se cree que existen otros sistemas que metabolizan al BPA, como las enzimas microsomales de citocromo P450 del hígado de rata que, al ser bloqueadas, inhiben el metabolismo del BPA (Yoshihara *et al.*, 2001). Este sistema genera otros metabolitos de BPA distintos a los mono y

diconjugados de glucurónido y sulfatación como quinonas, semiquinonas y BPA hidroxilado (Atkinson & Roy, 1995; Elsby *et al.*, 2001; Nakagawa & Suzuki, 2001; Shimizu *et al.*, 2002). Se han reportado también otros metabolitos como isopropil-hidroxifenol, conjugado de glutatión y BPA, glutationil-fenol, glutationil 4-isopropilfenol y dímeros de BPA (Jaeg *et al.*, 2004). Varios investigadores han sugerido que algunos de estos metabolitos distintos a los conjugados de glucurónido y sulfatación, como el 4-metil-2,4-bis(4-hidroxifenil) pent-1-eno (MBP), presentan actividad tóxica o estrogénica (Atkinson & Roy, 1995; Yoshihara *et al.*, 2004; Ishibashi *et al.*, 2005).

En los roedores adultos, el BPA administrado oralmente también se transforma con gran rapidez en monoglucurónido, sin embargo al estar altamente vinculado a la proteína plasmática excretada en la bilis, es liberado y reabsorbido a través del intestino en el torrente sanguíneo. Esta recirculación enterohepática puede ocurrir varias veces antes de que el BPA se excrete principalmente a través de las heces, por lo que se ha sugerido que la rata adulta es más sensible a sus efectos que el humano adulto (Sakamoto *et al.*, 2002). También se ha observado que una exposición continua a BPA lleva a un decremento en los niveles de UGT en ratas macho pero no en hembras, sugiriendo una mayor sensibilidad en ellos (Shibata *et al.*, 2002).

Se ha reportado que en el embarazo la glucuronidación hepática disminuye debido a un decremento en la UGT y que las concentraciones de BPA en tejidos fetales humanos y en la leche materna son muy similares a los encontrados en la sangre materna. Además, en ratas preñadas la excreción de metabolitos de BPA hacia la vena aumenta tres veces con respecto a ratas no preñadas, que los excretan principalmente en la bilis (Inoue *et al.*, 2004). Adicionalmente, se ha detectado la actividad de la β -glucuronidasa, enzima capaz de desconjugar el monoglucurónido de BPA, en el útero de ratas preñadas tanto en el epitelio luminal como en el glandular y en el estroma, sobre todo en las zonas de inter-implantación (Roy *et al.*, 1983). También se ha detectado esta enzima en el intestino, la placenta y el hígado fetal. De manera análoga, la arilsulfatasa C es una enzima que se

desarrolla *in utero*, se encuentra en los tejidos que responden a estrógenos y se cree que podría tener la capacidad de desconjugar el BPA sulfatado (Reed *et al.*, 2005; Tobacman *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2001).

Sumado a esta información, se ha observado que los niveles de UGT en el hígado fetal humano y de rata son menores a los del hígado adulto (Cappiello *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002; Strassburg *et al.*, 2002) y que el neonato no expresa esta enzima de manera constitutiva ni madura, por lo que se ha sugerido que los humanos y animales, fetales y neonatos, tienen una menor capacidad para conjugar el BPA en monoglucurónido pero no para sulfatarlo (Taylor *et al.*, 2008).

A pesar de las discrepancias en los resultados obtenidos en diversos estudios con respecto al metabolismo del BPA en el humano, los roedores, los adultos, los fetos y neonatos, existe evidencia del impacto del compuesto sobre la salud reproductiva, por lo que su estudio sigue siendo relevante.

3.3 Efectos adversos del BPA sobre la fertilidad

3.3.1 Efectos en humanos

Actualmente existe una gran preocupación con respecto a los factores ambientales que pueden estar teniendo un impacto negativo sobre la salud reproductiva debido al decremento en las tasas de embarazo en humanos y el incremento en la ocurrencia de enfermedades y desórdenes reproductivos tanto en el hombre como en la mujer.

Uno de los factores ambientales que ha llamado la atención es la exposición a disruptores endócrinos como el BPA. Se ha reportado, en mujeres, una asociación entre un incremento en las concentraciones de BPA en orina y un decremento en el número de folículos antrales, lo cual ha incrementado la preocupación por una acelerada pérdida de folículos y envejecimiento reproductivo (Souter *et al.*, 2013). Así mismo, se ha observado que el porcentaje de pacientes con concentraciones detectables de BPA es significativamente mayor en las pacientes infértiles

comparado con pacientes fértiles (Caserta *et al.*, 2013) y se ha asociado la exposición a BPA con abortos sucesivos (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2005).

También, en un estudio de fertilización *in vitro*, se observó una asociación linear positiva dosis-respuesta entre los niveles de BPA en orina y la falla de implantación (Ehrlich *et al.*, 2012). En otro estudio de fertilización *in vitro*, el BPA se detectó en la mayoría de las pacientes y se observó una correlación inversa entre la concentración de BPA y el número de óvulos recuperados y los niveles máximos de estradiol (E₂) (Mok-Lin *et al.*, 2010).

De igual manera, existe evidencia que relaciona al BPA con la fertilidad masculina. Diversos estudios han demostrado una asociación inversa entre los niveles internos de BPA en hombres y parámetros de calidad de semen como concentración, motilidad, velocidad y vitalidad de espermatozoides (Meeker *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Lassen *et al.*, 2014).

En un estudio con 191 hombres checos (caucásicos) se realizó un análisis de UHPLC-MS/MS con el fin de relacionar la concentración de BPA en el plasma sanguíneo y seminal (89 y 93% de detección, respectivamente) con la fertilidad. Los niveles de BPA en plasma seminal aumentaron conforme aumentaba la gravedad de la infertilidad y mostraron una correlación negativa con el conteo, concentración y morfología de espermatozoides. Por otro lado, en plasma sanguíneo se observaron concentraciones mayores de BPA en hombres ligera y moderadamente infértiles, pero no en los gravemente infértiles comparados con los sanos. Los autores sugieren que el BPA afecta de manera distinta la esteroidogénesis en distintas glándulas y que podría actuar activando la aromatasa, que es la enzima que transforma a la testosterona en E₂, ya que observaron cambios en los niveles de esteroides intermediarios en plasma seminal (esteroidogénesis testicular) y sanguíneo (esteroidogénesis adrenal), y una diferencia importante en la relación testosterona/estradiol (Vitku *et al.*, 2016).

Un estudio en Italia detectó una relación entre la concentración de BPA en plasma sanguíneo y seminal y el área de residencia, siendo esta mayor en hombres que

habitan zonas metropolitanas (ej. Roma). Se observó una mayor concentración en hombres infértiles en estas zonas, que en zonas urbanas (ej. Ferrara) y rurales (ej. Sora), así como una correlación positiva entre los niveles séricos de BPA y la expresión de ER α , ER β y AR en células mononucleares de sangre periférica (La Rocca *et al.*, 2015).

A pesar de que existen varios estudios cuyo objetivo es relacionar la exposición del humano al BPA con deficiencias en la salud reproductiva, los resultados obtenidos no siempre son reproducibles ni congruentes. Esta discrepancia puede deberse a numerosos factores como las características de las muestras, los parámetros evaluados o la metodología empleada para analizarlos, ya que estudios de este tipo en humanos presentan múltiples restricciones. Es por ello que se ha optado por realizar estudios en modelos animales, procurando tomar en cuenta las diferencias metabólicas entre especies.

3.3.2 Efectos en animales de experimentación

Se han realizado una gran cantidad de estudios en animales de laboratorio expuestos a dosis a las cuales actualmente está expuesto el ser humano o menores. Estos estudios indican que la exposición a BPA está asociada con anomalías morfológicas, funcionales y de conducta relacionada con la reproducción.

Los efectos que tiene el BPA en organismos adultos son reversibles cuando cesa la exposición (Richter *et al.*, 2007a), sin embargo se ha demostrado que la exposición inadvertida, constante y a largo plazo a disruptores endócrinos como el BPA durante periodos críticos para el desarrollo (cerca de la etapa postnatal y/o *in utero*), afectan el crecimiento y la salud reproductiva de los seres vivos de forma irreversible (Nava *et al.*, 2008).

Se ha observado, en diferentes cepas de rata, que la exposición durante el periodo perinatal produce en los organismos efectos organizacionales debidos a la exposición del órgano durante el desarrollo y que continúan durante la pubertad y resultan en una alteración persistente del sistema afectado (Richter *et al.* 2007a).

Es por ello que la mayor preocupación con respecto a la exposición al BPA es durante el desarrollo, es decir fetos, neonatos, infantes, niños y adolescentes.

Tomando esto en cuenta, diversos estudios se han enfocado en la exposición temprana al compuesto. Por ejemplo, se ha observado que una exposición de fetos de roedor a dosis bajas de BPA de 20 a 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día produce efectos estrogénicos postnatales. En machos, la producción diaria de espermatozoides se reduce (Vom Saal *et al.*, 1998) y aumenta el peso de la próstata (Nagel *et al.*, 1997), y en la hembra, el desarrollo del tejido reproductivo se ve modificado, se altera la diferenciación sexual del cerebro (Ryan & Vandenberg, 2006), se presentan cambios en los niveles de la hormona luteinizante en suero (Rubin *et al.*, 2001), se presenta apertura vaginal temprana (Honma *et al.*, 2002), alteraciones en el ciclo estral (Rubin *et al.*, 2001; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011), cambios a largo plazo en la vagina (Schönfelder *et al.*, 2002b), el útero (Schönfelder *et al.*, 2004; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011), los ovarios y las glándulas mamarias (Markey *et al.*, 2001), y el crecimiento y la pubertad se aceleran (Howdeshell *et al.*, 1999), lo que indica una amplia gama de tejidos afectados por el compuesto (Markey *et al.*, 2003; Welshons *et al.*, 2006).

En el útero, hay estudios que demuestran que la muerte celular del epitelio uterino se ve alterada (disminuye) en la progenie de las ratas tratadas con BPA (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011). Así mismo se han reportado, en el útero de estos animales, lesiones proliferativas del oviducto, metaplasias escamosas, hiperplasias atípicas, pólipos estromales y carcinogénesis (Newbold *et al.*, 2009 & 2007), los cuales se pueden deber al incremento de proliferación y el decremento de muerte celular (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011; Newbold *et al.*, 2009).

Con respecto a la función reproductiva, se realizó un estudio en el que se expuso perinatalmente a ratones hembra a 0.25 ng, 250 ng y 25 μg de BPA/kg de peso corporal (pc) al día, del día 8 de gestación (DG8) al día 16 de lactancia. Al llegar a edad adulta, se evaluó su fertilidad, encontrando un menor número de hembras preñadas y camadas más pequeñas, así como un declive reproductivo temprano con la dosis alta. Como es común con los disruptores endócrinos, no se observó

un efecto dosis-respuesta, lo que puede sugerir inconvenientes en la determinación de la IDA y el NOAEL del BPA (Cabaton *et al.*, 2011). Se ha demostrado también que dosis de 200 y 300 mg de BPA/kg de pc administradas del DG1 al DG4 reducen los niveles de progesterona (P_4) así como el número de sitios de implantación, y aumentan el área luminal y la altura de las células epiteliales al DG6 (Berger *et al.*, 2008). De igual manera, se ha observado que al administrar de forma subcutánea 10 mg de BPA/kg de pc al día, del DG1 al DG8 a ratones, se presenta una disminución en el número de crías (Tachibana *et al.*, 2007). Se ha sugerido también que el BPA es un disruptor de meiosis (Briño-Enríquez *et al.*, 2011), lo cual podría llevar a aneuploidía, que es considerada la causa más común conocida del retraso mental así como la causa genética de infertilidad en humanos (Hassold & Hunt, 2001).

En otro estudio (Xiao *et al.*, 2011), se trató de forma subcutánea a ratones hembra con 0.5, 10, 40 y 100 mg de BPA/ kg de pc al día, del DG0.5 al DG3.5. Se observó una implantación tardía y un aumento en la mortandad perinatal con la dosis de 40 mg de BPA/kg de pc al día. La evidencia de la sugerida implantación tardía radicó en la presencia de sitios de implantación más pequeños y menos vascularizados, así como una intensa expresión de los receptores a P_4 (PR) posterior al día de la implantación teórica y un epitelio luminal delgado sin zona decidual al DG4.5. De igual forma, se observó un periodo de gestación más largo comparado con el control, así como camadas más pequeñas y supervivencia perinatal menor. Con la dosis de 100 mg de BPA/kg de pc al día, no se observaron sitios de implantación al DG4.5 pero sí se observaron embriones retenidos en el oviducto y desarrollo tardío de embriones al DG3.5 con la misma dosis, sugiriendo que el disruptor genera una alteración en el desarrollo y transporte del embrión desde el oviducto hacia el útero. Un experimento adicional en el que se transfirieron embriones sanos a madres pseudopreñadas tratadas con la dosis de 100 mg demostró que a pesar de un desarrollo y transporte adecuados del embrión, no se observaron sitios de implantación al DG4.5, lo que sugiere que además de afectar estos dos factores, el BPA altera la receptividad del útero hacia el blastocisto.

De manera similar, un estudio realizado por Bosquiazzo *et al.* (2010) en el que ratas neonatas fueron inyectadas con 0.05 y 20 mg de BPA/kg de pc al día en los días postnatales 1, 3, 5 y 7 y posteriormente fueron ovariectomizadas y administradas con hormonas exógenas, demostró una disminución en la inducción de la proliferación endotelial y en la expresión de mRNA del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en el útero con ambas dosis (sin efecto dosis/respuesta). Los resultados encontrados son relevantes debido a que la generación de nueva vascularización estromal es esencial para la implantación del embrión y su desarrollo. Se sabe que la expresión de VEGF, a nivel transcripcional, aumenta en el epitelio luminal debido a los estrógenos como el E₂ y en el estroma debido a la P₄, aunque no necesariamente es debido a la unión con sus receptores nucleares, por lo que las alteraciones debidas al BPA pueden estar tanto a nivel de receptores como a nivel de expresión de genes hormona-dependientes, interacción con elementos reguladores u otros factores de transcripción.

En cuanto al efecto sobre la fertilidad masculina, se han realizado diversos estudios con animales macho. Por ejemplo, se ha observado una reducción en los niveles séricos de testosterona y la expresión de StAR, que es una proteína involucrada en la esteroidogénesis, así como el incremento en daño de DNA en roedores con diversos tratamientos con BPA (Chouhan *et al.*, 2015; Tiwari & Vanage, 2013).

De igual manera, un tratamiento *in vitro* de espermatozoides de ratón con diferentes concentraciones de BPA (0.0001, 0.01, 1 y 100 mM) durante 6 horas mostró que a altas concentraciones del compuesto, este inhibió la motilidad de los espermatozoides disminuyendo los niveles de ATP. También se observó una reacción acrosomal precoz que resultó en una fertilización pobre y un desarrollo embrionario comprometido. Los autores sugieren que el mecanismo de acción es la fosforilación de proteínas relacionadas con la fertilidad, ya que observaron un aumento en la actividad de la proteína cinasa A (PKA) y de sus substratos fosforilados (Rahman *et al.*, 2015).

Con resultados similares, un estudio en el que se trató neonatalmente a ratas macho (F1) con el compuesto demostró un decremento en el conteo y la motilidad de espermatozoides, así como un aumento en la pérdida postimplantación y camadas más pequeñas al ser apareados con hembras sanas. Además, se observó una reducción en el perfil de expresión de receptores a esteroides en los testículos tanto de F1 como de F2 y F3, por lo que se sugirió un efecto transgeneracional (Salian *et al.*, 2009a). Con el fin de dilucidar las causas de estos efectos, el mismo grupo de investigación llevó a cabo otro estudio muy similar en el que ratas hembra F0 fueron tratadas oralmente con BPA (1.2 y 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc al día) del DG12 al día postnatal 21 y se obtuvieron las generaciones F2 y F3, con las crías macho F1. En este estudio se observó una reducción significativa en la expresión de SRC-1, que es un coactivador del receptor a esteroides, en los testículos de las generaciones F1, F2 y F3, por lo que los autores llegaron a la conclusión de que la exposición perinatal de las ratas macho al BPA resultó en perturbaciones transgeneracionales en el perfil de expresión de receptores a esteroides y sus correguladores en el testículo, teniendo efectos en su fertilidad llegada la etapa adulta (Salian *et al.*, 2009b).

En otro estudio, la exposición neonatal de ratas macho (F0) a BPA (2.4 $\mu\text{g}/\text{cría}$) demostró cambios epigenéticos en sus embriones F1 reabsorbidos. Se observó una expresión disminuida de *Igf2*, un gen indispensable para el desarrollo fetal, y *H19*, un gen involucrado en la proliferación celular, en los embriones reabsorbidos comparados con los embriones viables. Los espermatozoides de F0 mostraron el mismo patrón de metilación aberrante que sus embriones F1 reabsorbidos en la región de control de la impronta, por lo que se concluye que el BPA generó cambios epigenéticos en los machos F0 que fueron heredados por los embriones F1 causando la pérdida postimplantación (Doshi *et al.*, 2013).

Puede notarse en los resultados obtenidos por los estudios mencionados que el BPA tiene consecuencias observables sobre los organismos expuestos a él, teniendo efectos distintos al tener diversas variables, por lo que más estudios relacionados con este disruptor permitirían elucidar un poco más sus mecanismos

de acción. Además, ya que tiene efectos tanto en hembras como en machos, el estudio de un posible efecto aditivo sobre la fertilidad resulta relevante.

3.4 Proteínas de adhesión

Los eventos que llevan a la implantación del blastocisto en la rata ocurren durante los primeros 6 días de gestación. El día uno se define como el día posterior al apareamiento y se considera representativo del día del estro. El día tres representa el periodo de pre-implantación en el que el útero sufre diversos cambios para conferirle receptividad. Durante el día 5 el blastocisto, que es el óvulo fecundado un poco más desarrollado, se acerca a la pared uterina (aposición del blastocisto) y comienza a adherirse por medio de proteínas de adhesión al epitelio luminal uterino. La implantación, definida como la adhesión irreversible del blastocisto al epitelio luminal, se completa en el día 6. En el día 7, el blastocisto atraviesa el epitelio luminal hasta el estroma materno por penetración por desplazamiento, por lo que deben perderse las adhesiones focales entre el epitelio y la matriz extracelular (Murphy, 1993), las uniones adherentes entre las células del epitelio luminal uterino (CELU) y debe ocurrir el proceso de apoptosis en algunas de las CELU. El proceso de implantación en el humano es bastante similar, con ligeros cambios en los tiempos (Figura 2).



Figura 2. Proceso de implantación del blastocisto humano. Modificado de Weimar *et al.*, 2013.

La implantación exitosa del blastocisto durante las primeras etapas del embarazo involucra una serie de cambios, regulados por hormonas, en las CELU que las hacen receptivas a la adhesión de las células del trofoblasto, que es una capa de células que forma la parte externa del blastocisto (Figura 3). Estos cambios implican una reorganización de la membrana plasmática y del citoesqueleto de las células epiteliales y a este proceso se le conoce como “transformación de la membrana plasmática” (Murphy & Shaw, 1994; Murphy, 2000b). Esta transformación involucra cambios en la altura de las CELU, la longitud y la forma de los microvilli, la expresión de marcadores de superficie celular, la composición lipídica de la membrana plasmática, el citoesqueleto y las proteínas que lo componen, y se ha sugerido que modificaciones de las estructuras de unión que están asociadas a la membrana plasmática lateral de las células epiteliales, llamadas uniones estrechas, también forman parte de esta transformación (Murphy, 1993 & 2000a).

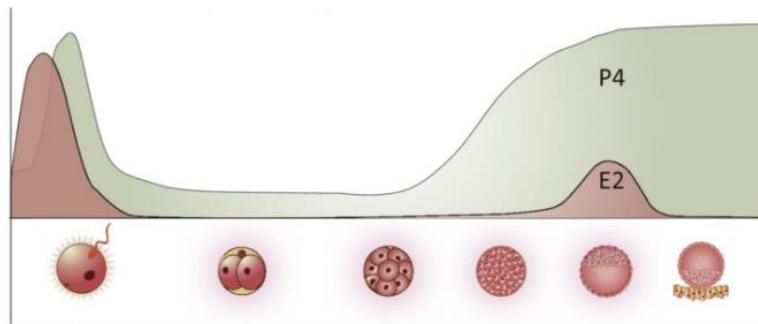


Figura 3. Niveles de estradiol (E2) y progesterona (P4) en la gestación temprana. Modificado de Zhang *et al.* (2017).

Entre las moléculas de superficie celular expresadas en el epitelio luminal uterino como parte de la transformación de la membrana plasmática se encuentran las proteínas de adhesión, que funcionan como puentes entre el trofoblasto y las células epiteliales ya que, después de la aposición, se requiere un contacto molecular entre el útero y el blastocisto para que pueda llevarse a cabo la unión irreversible y la posterior penetración hacia el estroma. Se sabe que el blastocisto también expresa este tipo de proteínas para facilitar la adhesión al epitelio previa a la implantación.

Dos ejemplos de estas proteínas de adhesión son la Integrina $\beta 3$ y la E-cadherina, que se expresan tanto en el epitelio luminal uterino como en los blastocistos de ratas y humanos durante el proceso de adhesión e implantación (Campbell *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 2011; Apparao *et al.*, 2001; Slater *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2004; Thie *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2015) por lo que la alteración de sus patrones y niveles de expresión podría resultar en fallas en cualquiera de estos dos procesos.

3.4.1 Integrina $\beta 3$

Las adhesiones focales son complejos proteicos que se localizan en la región basal de las células epiteliales, funcionando como ancla a la matriz extracelular (Ruoslahti *et al.*, 1991 & 1996). En especies en las que el blastocisto penetra al estroma por desplazamiento, como lo son los roedores y el humano, las CELU deben ser removidas (Schlafke & Enders, 1975). Estudios previos han demostrado que las CELU de rata pierden las adhesiones focales en el momento de la implantación en respuesta a P_4 para permitir la penetración del blastocisto (Shion & Murphy, 1995; Kaneko *et al.* 2008). Algunas proteínas intracelulares asociadas con las adhesiones focales son la actopaxina, vinculina, talina y paxilina (Turner, 2000), mientras que las membranales incluyen a las integrinas, que son una familia de glicoproteínas transmembranales heterodiméricas formadas por la asociación no covalente de una subunidad α y una subunidad β . Estas subunidades contienen un dominio extracelular que funciona como receptor a la matriz extracelular, uno transmembranal y uno citoplasmático que interactúa con el citoesqueleto (Vuori, 1998; Brown & Turner, 2004).

3.4.1.1 Papel de integrinas durante la gestación

Se ha correlacionado un patrón de expresión de integrinas en el endometrio humano con la fertilidad y la implantación (Lessey *et al.*, 1992; Lessey, 2000a; Klentzeris *et al.*, 1993; Bronson & Fusi, 1996; Ceydeli *et al.*, 2006). Mientras que la mayoría de las integrinas se expresa de forma constitutiva a lo largo del ciclo menstrual, algunas exhiben un patrón de expresión hormono dependiente. Así, las

integrinas cuya expresión aumenta durante la ventana de implantación se consideran marcadores de receptividad uterina (Lessey *et al.*, 2000; Reddy & Mangale, 2003; Wang & Armant, 2002).

Un ejemplo de estas integrinas es la $\alpha\beta3$, cuya expresión ha sido detectada por métodos inmunohistoquímicos en la superficie de las CELU humanas (Apparao *et al.*, 2001). Sus ligandos conocidos de matriz extracelular son citotactina, fibronectina, laminina, metaloproteinasa de matriz-2, osteopontina, osteomodulina, protrombina, trombospondina, vitronectina y factor de von Willebrand. Su expresión específica de acuerdo con el ciclo menstrual sugiere una regulación hormono dependiente. Se piensa que tanto los estrógenos como la P_4 actúan como factores parácrinos estromales que inducen la expresión epitelial de integrina $\beta3$ que da pie a la formación del complejo $\alpha\beta3$ (Lessey, 2003). De igual manera, se ha observado la presencia de la subunidad integrina $\beta3$ en el útero receptivo de mujeres y una disminución en su expresión en mujeres infértiles (Merviel *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 1999). Se ha observado también la expresión de esta integrina junto con otras moléculas de adhesión en blastocistos humanos, por lo que se cree que también tiene funciones de adhesión en el trofoblasto (Campbell *et al.*, 1995; Staun-Ram & Shalev, 2005; Snir *et al.*, 2010).

Por estas razones, la integrina $\beta3$ suele considerarse un marcador de receptividad endometrial, en particular para la adhesión embrional (junto con αv) funcionando como un puente entre el endometrio y el trofoblasto (Sueoka *et al.*, 1997; Simón *et al.*, 1998; Lessey, 2000b; Wang & Armant, 2002).

En rata se ha observado una tendencia similar, ya que se ha demostrado la expresión de integrina $\beta3$ en la región basal de las CELU en el DG1 y una localización apical en el momento de la implantación (Srinivasan *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2011). Se ha detectado su presencia por métodos inmunohistoquímicos desde el DG4, aumentando en el DG5 y aún más en el DG6, donde se localizó principalmente en los sitios de implantación. De igual manera, se detectó un aumento de los niveles de integrina $\beta3$ en respuesta a P_4 y a la combinación de P_4 y estrógenos en animales ovariectomizados, así como en

células epiteliales endometriales co-cultivadas con blastocistos, por lo que se sugiere que su presencia también tiene un efecto en la expresión de esta proteína (Srinivasan *et al.*, 2009). De igual manera, en un estudio en el que se cultivaron células de Ishikawa (línea celular de epitelio endometrial) en un medio libre de células donde previamente se habían cultivado blastocistos humanos, se observó un aumento en la expresión del gen HOXA10, que a su vez aumenta la expresión de la integrina $\beta 3$ (Sakkas, 2011). Sumado a esto, en un estudio *in vitro* se localizó la integrina $\beta 3$ en la membrana apical de las células del trofoblasto de rata y se observó una reducción en la adhesión del trofoblasto a células Ishikawa al bloquear la expresión de la integrina $\beta 3$ en estas últimas con un siRNA (Kaneko *et al.*, 2011). Se concluye por tanto que la integrina $\beta 3$ tiene un papel importante en la adhesión del blastocisto al epitelio luminal mediado principalmente por P_4 .

3.4.1.2 Efecto del BPA sobre la expresión de integrina $\beta 3$

En cuanto al efecto que podría tener el BPA sobre la expresión de esta proteína, existe un estudio en el que se le administró oralmente el compuesto (400 o 600 mg/kg de pc al día) a ratones hembra preñadas y se observó, junto con un decremento en el número de sitios de implantación, una disminución en la expresión de la integrina $\beta 3$ tanto en el endometrio como en los blastocistos (Pan *et al.*, 2015). En otro estudio, ratas neonatas fueron tratadas de forma subcutánea con 0.05 mg y 20 mg de BPA/kg de pc/día, en los días postnatales 1, 3, 5 y 7 y se evaluaron los efectos a largo plazo. Al aparear a las hembras sexualmente maduras que habían sido tratadas neonatalmente, se encontró una menor expresión del gen HOXA10 al DG5 con ambas dosis. Como ya se mencionó, este gen está involucrado en la preparación del útero para la implantación y su expresión está regulada por E_2 y P_4 . No se encontraron diferencias en los niveles séricos de E_2 ni P_4 al DG5, pero sí en sus receptores uterinos ($ER\alpha$ y PR) cuyos niveles fueron menores en las ratas tratadas. A pesar de que todas las ratas mostraron una conducta de receptividad sexual y de que no se encontraron diferencias en las tasas de ovulación, el índice de fecundación disminuyó con el aumento de la dosis (10% para la dosis baja y 23% para la dosis alta). El número

de sitios de implantación, es decir, el número de blastocistos adheridos al útero, disminuyó con ambas dosis, siendo esta reducción estadísticamente significativa únicamente con la dosis alta. De igual forma y en concordancia con lo anterior, se observó una menor expresión de integrina $\beta 3$ en el útero de los animales tratados. Debido a la amplia gama de efectos, los investigadores que llevaron a cabo este estudio concluyeron que es posible que el BPA afecte el eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (Varayoud *et al.*, 2011).

3.4.1.3 Interacción de integrinas con otras proteínas de adhesiones focales.

Sumado a lo anterior, se ha establecido que las subunidades β de las integrinas interaccionan con proteínas de unión a actina como la talina (Pfaff *et al.* 1998; Calderwood *et al.* 1999; Critchley 2000; Calderwood & Ginsberg, 2003; Calderwood 2004a, 2004b). Particularmente, se ha demostrado que las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ colocalizan e interaccionan directamente con talina en las adhesiones focales *in vitro* (Critchley, 2000; Calderwood & Ginsberg, 2003; Reddy & Mangale, 2003; Calderwood 2004b; Kaneko *et al.*, 2011). Así, la talina provee un vínculo directo entre el dominio citoplasmático de las integrinas y las fibras intracelulares de actina (Nayal *et al.* 2004) (Figura 4). También está involucrada en la activación de las integrinas, que es esencial en el establecimiento de las adhesiones focales (Tadokoro *et al.*, 2003; Yamada & Geiger, 1997).

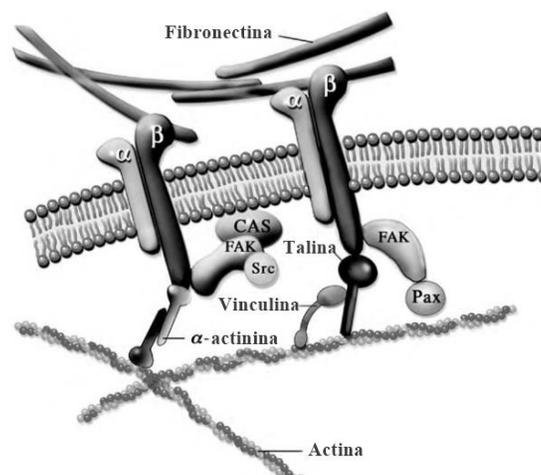


Figura 4. Interacción de talina y paxilina con integrinas en adhesiones focales. Modificado de Mofrad & Kamm, 2006.

A su vez, la paxilina es una proteína que interacciona con las integrinas por medio de la cinasa de adhesión focal (FAK) y con las fibras de actina por medio de actopaxina y vinculina (Turner *et al.*, 1990; Turner, 2000; Schaller, 2001). En la rata, se ha observado que su señal desaparece de la membrana basal en el momento de la implantación y reaparece en el DG7 (Lindsay *et al.*, 2016).

Como puede deducirse de la bibliografía, la integrina $\beta 3$ juega un papel importante en la adhesión e implantación del blastocisto tanto en humanos como en ratas, por lo que si su patrón o sus niveles de expresión se ven alterados por un compuesto exógeno, esto podría llevar a una fertilidad reducida. Además, por su interacción con esta proteína y su papel en la implantación, la alteración de los patrones de distribución y/o niveles de otras proteínas de adhesiones focales como la talina o la paxilina en el epitelio luminal uterino durante la gestación temprana también podría resultar en una menor fertilidad.

3.4.2 Talina

Los vertebrados poseen dos genes que codifican para talinas (1 y 2) estrechamente relacionadas que comparten el 74% de identidad de aminoácidos. Estas dos proteínas se expresan de manera diferencial en los tejidos y, ya que la talina 1 parece ser la forma dominante, es también la más estudiada y a la que se hará referencia en el presente proyecto (Critchley, 2009; Kopp *et al.*, 2010).

La talina es uno de las principales componentes de las adhesiones focales. Es una proteína de 270 kDa y 2541 aminoácidos que está formada por dos dominios principales: una cabeza (N-terminal) y una cola (C-terminal).

El dominio de la cabeza (aa 1-400) es globular y rico en aminoácidos básicos, y su principal función es la unión y activación de integrinas, así como la unión a fosfolípidos ácidos membranales y FAK (Niggli *et al.*, 1994). Específicamente, la cabeza tiene sitios de unión a las colas (citoplasmáticas) de las subunidades beta de las integrinas (Chen *et al.*, 1995; Calderwood *et al.*, 1999; Martel *et al.*, 2001; Tadokoro *et al.*, 2003; Anthis *et al.*, 2009).

La activación de las integrinas consiste en el aumento de la afinidad de estas por sus ligandos extracelulares, ya sea a partir de señales intracelulares (inside-out) o extracelulares (outside-in) (Kim *et al.*, 2011; Shattil *et al.*, 2010). Estos dos procesos de señalización y activación son conceptualmente independientes entre sí, sin embargo, son también mutuamente cooperativos, por lo que cada uno puede llevar hasta el otro. De cualquier manera, la activación por talina (inside-out) es esencial. La interacción simultánea de la cabeza de talina con las colas de integrina y los fosfolípidos membranales, es capaz de modificar el ángulo de inclinación de las integrinas (Kim *et al.*, 2012). Este cambio desestabiliza interacciones específicas y desplaza el equilibrio hacia la conformación activa de la región extracelular de las integrinas (Figura 5). Debido a esto, en diversos tipos celulares el fenotipo carente de talina es similar al del knockout de integrinas (Cram *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2002).

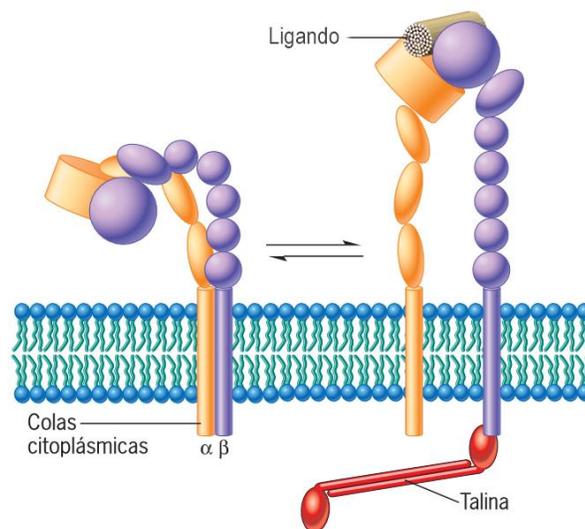


Figura 5. Activación de integrinas por medio de unión a talina. Modificado de Karp, 2011.

Ya que juega un papel clave en la activación de integrinas, la función de talina está altamente regulada. Los mecanismos involucrados en esta regulación incluyen cambios en la conformación y localización de la proteína (que a su vez son inducidos por vías de señalización y fuerzas mecánicas), la acción de proteínas competitivas y la proteólisis limitada (Calderwood *et al.*, 2013). Se ha sugerido que la conformación inactiva de talina, en la que una segunda unión

entre la cabeza y la cola impide estéricamente la unión a las colas de integrina, se encuentra en zonas citosólicas más alejadas de la membrana plasmática (Banno *et al.*, 2012). También se ha especulado que esta proteína existe en configuraciones alternativas que dependen del estado de desarrollo y el tipo de células en los que se encuentra (Klapholz *et al.*, 2015).

Por otro lado, el dominio de la cola C-terminal comprende los aminoácidos 487-2541 que forman 63 α -hélices organizadas en haces de 4 o 5 hélices (Papagrigoriou *et al.*, 2004). Además de los 13 haces, existe una α -hélice en el extremo C-terminal que corresponde al dominio de dimerización (Goult *et al.*, 2013). Esta cola contiene un sitio de unión a integrina y diversos sitios de unión a actina, de los cuales el mejor caracterizado está asociado con el haz más próximo al extremo C-terminal (Gingras *et al.*, 2010; Moes *et al.*, 2007; Hemmings *et al.*, 1996). Se ha observado que la dimerización es esencial para la actividad del sitio de unión a actina del C-terminal (Gingras *et al.*, 2008).

Además de su papel estructural, la cola de talina contiene diversos sitios de unión involucrados en la regulación de otras proteínas estructurales y de señalización. Los más relevantes de estos son los 11 sitios de unión a vinculina (Critchley, 2009). La vinculina suele encontrarse en un estado de autoinhibición debido a una interacción entre la cabeza y la cola, impidiendo así su unión con otras proteínas como paxilina. Sin embargo, la unión de su cabeza a los sitios de unión en la cola de talina genera un cambio conformacional que descubre sus sitios de unión (Bois *et al.*, 2006; Carisey *et al.*, 2013). En concordancia con esto, en células epiteliales carentes de talina, no se detecta la presencia de vinculina, paxilina ni FAK en las adhesiones focales (Lawson & Schlaepfer, 2012; Wang *et al.*, 2011).

Se sabe que la talina es sustrato de la calpaína II, proteasa intracelular dependiente del catión divalente de calcio que es capaz de separar la cabeza de la cola (Rees *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001). Se ha propuesto que estos dos dominios de talina tienen actividades distintas e independientes, por lo que se cree que la calpaína II tiene un papel importante en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales (Franco *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011).

3.4.2.1 Expresión de talina en el útero de rata durante la gestación temprana

En cuanto a su relación con la implantación, se ha observado en ratas que la talina se encuentra en la región basal de las CELU en el DG1 y que desaparece de esta región en el día 6 con el fin de fomentar la penetración del blastocisto hacia el estroma (Kaneko *et al.*, 2008). Además, en ratas ovariectomizadas se demostró que el comportamiento de esta proteína en el día 1 es dependiente de estrógenos, mientras que su desaparición al día 6 es dependiente de P_4 (Kaneko *et al.*, 2009). Se ha observado también una ligera señal apical de talina en las CELU al DG6 (Lindsay *et al.*, 2016).

Como ya se mencionó, ensayos de inmunoprecipitación han demostrado que la talina interacciona directamente con integrina β_3 , proteína ampliamente relacionada con la adhesión inicial del blastocisto al epitelio. Con base en esto, su regulación dependiente de hormonas en el útero y la importancia de las adhesiones focales en el proceso de implantación, se deduce que la alteración en los niveles o la localización de talina podría tener un efecto sobre la fertilidad.

3.4.3 Paxilina

La paxilina es otro de los principales componentes de las adhesiones focales. Existen cuatro isoformas de paxilina (α , β , γ y δ) derivadas de la transcripción de un solo gen (Mazaki *et al.*, 1997; Turner & Miller, 1994; Tumbarello *et al.*, 2005), sin embargo, ya que la α es la forma predominante, es a la que se hará referencia en el presente proyecto. La isoforma α de paxilina es una fosfoproteína de 68 kDa (Glenney Jr & Zokas, 1989) que sirve como plataforma en la interfase entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. Participa en el reclutamiento de numerosas proteínas reguladoras y estructurales que juntas controlan los cambios dinámicos de la adhesión celular, la reorganización del citoesqueleto y la expresión génica necesarios para la supervivencia y la migración celular (Turner, 2000). Al igual que talina, consta de dos dominios principales: la región del C-terminal y la del N-terminal.

La región del C-terminal contiene cuatro dominios LIM (Lin11, Isl-1, Mec-3), es decir, motivos de dedos dobles de zinc ricos en cisteína que median interacciones proteína-proteína (Perez-Alvarado *et al.*, 1994; Schmeichel & Beckerle, 1994; Dawid *et al.*, 1998). Estos motivos son responsables de la unión a fosfatasa y tubulina, además de la localización de la paxilina en las adhesiones focales, particularmente mediada por LIM2 y LIM3 (Brown *et al.*, 1996).

La región N-terminal, por otro lado, controla la mayor parte de la actividad de señalización de la paxilina, ya que contiene cinco motivos ricos en leucina y aspartato (LD) que son módulos de unión a proteína que contienen la secuencia consenso LDxLLxxL (Tumbarello *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 1998b). La región N-terminal contiene además una región rica en prolina, involucrada en la unión al dominio SH3 de la cinasa de tirosina Src y residuos de unión a SH2 (Brown *et al.*, 1998b; Brown *et al.*, 1996; Cote *et al.*, 1999; Herreros *et al.*, 2000; Schaller & Parsons, 1995; Tumbarello *et al.*, 2002; Turner, 2000; Weng *et al.*, 1993).

Los motivos LD son responsables del reclutamiento de proteínas como vinculina, actopaxina, ILK (cinasa ligada a integrinas), FAK, entre otras. Particularmente, se ha demostrado que la vinculina se une a los motivos LD1, 2 y 4 de la paxilina (Brown *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1999), por lo que se ha sugerido que funciona como un vínculo directo entre esta proteína y la actina, y que esta interacción tiene un efecto antiapoptótico en las células (Turner *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1999; Subauste *et al.*, 2004). Además, la cinasa de serina y treonina ILK, que es capaz de unirse a la paxilina por medio del motivo LD1, colocaliza con integrinas en las adhesiones focales y tiene una interacción directa con las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ (Nikolopoulos & Turner, 2001; Dedhar, 2000).

La paxilina, junto con FAK, es una de las primeras proteínas en ser detectadas en adhesiones nacientes (Digman *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2011) y es además un regulador clave de las enzimas que estimulan el ensamblaje de nuevos complejos de adhesión celular, así como su maduración y el desensamblaje de complejos de adhesión existentes en el proceso de migración celular (Ridley, 2001b; Raftopoulou & Hall, 2004; Webb *et al.*, 2004). De manera más específica, la unión

de integrinas a substratos extracelulares específicos promueve la fosforilación mediada por FAK y Src de las tirosinas 31 y 118 de la paxilina. A su vez, estas tirosinas fosforiladas interaccionan con complejos que promueven la migración celular, lo que implica que la paxilina está directamente involucrada en la señalización mediada por integrinas (Bellis *et al.*, 1997; Burridge *et al.*, 1992; Petit *et al.*, 2000; Schaller & Parsons, 1995; Zaidel-Bar *et al.*, 2007b; Nobes & Hall, 1995; Tsubouchi *et al.*, 2002; Lamorte *et al.*, 2003).

Al igual que la talina, la paxilina es también sustrato de la proteasa dependiente de calcio calpaína II que es capaz de cortar entre los motivos LD1 y LD2 y, ya que se ha propuesto también una actividad independiente de ambos segmentos de la paxilina, se refuerza la teoría de que esta proteasa tiene un papel importante en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales (Yamaguchi *et al.*, 1994; Carragher *et al.*, 1999; Cortesio *et al.*, 2011; Sero *et al.*, 2012).

3.4.3.1 Expresión de paxilina en el útero de rata durante la gestación temprana

En cuanto a su relación con la implantación, al igual que talina, se ha observado que en ratas se encuentra en la región basal de las CELU en el DG1, que desaparece de esta región en el día 6, y que estos comportamientos son dependientes de estrógenos y P₄, respectivamente (Kaneko *et al.*, 2008; Kaneko *et al.*, 2009).

Tomando en cuenta su regulación dependiente de hormonas en el útero, su participación en la señalización mediada por integrinas y su papel en la relocalización de los complejos de adhesión, importante en el proceso de implantación, es posible deducir que la alteración en los niveles o la localización de paxilina podría tener un efecto sobre la fertilidad.

3.4.4 E-cadherina

Las cadherinas son glicoproteínas transmembranales dependientes de calcio responsables de las uniones célula-célula. Al igual que las integrinas, tienen un

dominio extracelular, uno transmembranal y uno intracelular. La región extracelular tiene 5 dominios con sitios de unión al catión divalente de calcio que les permiten formar dímeros funcionales con otra molécula de cadherina adyacente. Estos dímeros son capaces de interactuar con los dímeros de cadherina de células vecinas. La región intracelular interactúa con el citoesqueleto por medio de las cateninas, que son otras proteínas citoplasmáticas (Sánchez *et al.*, 2005; Trejo, 2008) (Figura 6).

La E-cadherina (epithelial) o uvomorulina se expresa únicamente en células epiteliales en organismos adultos y suele encontrarse en las uniones adherentes, que son complejos proteicos de adhesión intercelular localizados en la membrana plasmática, en un sitio más basal que las uniones estrechas (Fukuda & Sugihara, 2008). Sin embargo, se expresa también en las células tempranas de embriones de mamíferos y se sabe que juega un papel indispensable en la compactación celular y la formación del blastocisto (Frenette & Wagner, 1996; Floridon *et al.*, 2000).

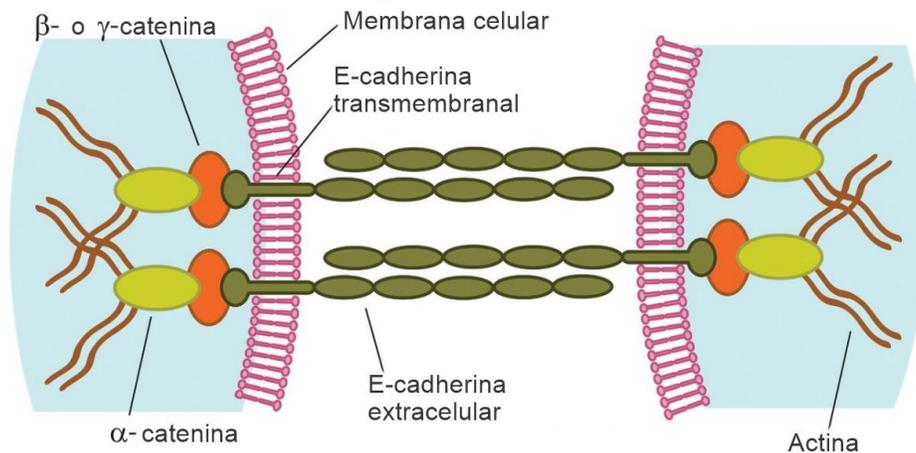


Figura 6. E-cadherina en uniones adherentes. Modificado de Perry *et al.*, 2009.

3.4.4.1 Papel de E-cadherina en el útero y blastocisto de rata durante la gestación temprana

Se ha observado E-cadherina en blastocistos humanos (Campbell *et al.*, 1995; Bloor *et al.*, 2002; Liu & Xing, 2003) y CELU humanas (Thie *et al.*, 1995), así como

la formación de un complejo similar a los desmosomas entre la superficie celular apical del trofoblasto y el endometrio humano durante la implantación (Lindenberg *et al.*, 1986). También se ha detectado una disminución de E-cadherina en los sitios de contacto entre célula y célula epitelial como respuesta a un aumento en la concentración intracelular de calcio (Li *et al.*, 2002). Estas observaciones sugieren que las CELU cambian su polaridad después del contacto inicial con el trofoblasto y que esta redistribución de moléculas de adhesión es afectada por el catión divalente de calcio (Gumbiner, 1992).

De igual manera, en un estudio *in vitro* con células Ishikawa y JAR (células de características semejantes al trofoblasto), se observó una mayor capacidad de adhesión entre ellas al aumentar la expresión de E-cadherina de forma exógena (Shirane *et al.*, 2012). Además, se ha detectado su expresión en el endometrio de mujeres sanas en la fase de peri-implantación (Dawood *et al.*, 1998).

Así mismo, se ha observado que durante la gestación temprana en la rata, la expresión de la E-cadherina es lateral en el día 3 y apical en el día 6 en la membrana plasmática de las CELU (Slater *et al.*, 2002; Reuss *et al.*, 1996). También se ha localizado por ensayos inmunohistoquímicos en la región apical de la membrana endometrial del útero de ratón en la fase de peri-implantación, siendo mayor su expresión en los sitios de implantación (Jha *et al.*, 2006).

En un estudio en el que se expuso a ratones hembra preñadas del DG2 al DG8 a un macho distinto al presentado para el apareamiento, se observó un decremento en el número de sitios de implantación al DG6 y al DG8. Esta disminución se vio acompañada de un aumento en el área luminal uterina y un decremento en los niveles de E-cadherina uterina y P₄ sérica (Rajabi *et al.*, 2014).

En blastocistos de ratón se ha observado E-cadherina en la interfase célula-célula (Fleming *et al.*, 2001; Watson & Barcroft, 2001) y un tratamiento *in vitro* de embriones compactos de ratón con un anticuerpo neutralizador de E-cadherina resultó en la pérdida de compactación y viabilidad de los mismos (Thomas *et al.*, 2004). En otro estudio, embriones de ratón sin E-cadherina mostraron un

desarrollo defectuoso y no fueron capaces de implantarse (Larue *et al.* 1994; Riethmacher *et al.* 1995).

Ya que la E-cadherina se encuentra tanto en el epitelio luminal como en el trofoblasto, ayuda en la compactación del blastocisto, causa que el útero se cierre y fomenta la adhesión entre el blastocisto y el epitelio uterino, se concluye que tiene un papel importante en la adhesión inicial del embrión al útero y en la implantación (Coutifaris *et al.* 1991; Slater *et al.*, 2002; White & Plachta, 2015) y que su expresión se regula de manera hormonal (promovida por P₄) (Jha *et al.*, 2006) y epigenética por medio de la metilación del DNA (Rahnama *et al.*, 2009).

3.4.4.2 Efecto del BPA sobre la expresión de E-cadherina

En cuanto al posible efecto del BPA sobre esta proteína, en un estudio en el que se les administró de forma subcutánea diferentes dosis de BPA (3, 4 o 5 mg/día) a ratones hembra preñadas del DG2 al DG5, se observó al DG6 un aumento en el área luminal así como una disminución en la proporción de células epiteliales que expresaron E-cadherina con las dos dosis más altas. Adicionalmente, se observó una disminución en el número de sitios de implantación al combinar la exposición al BPA con estrés por depredador (Borman *et al.*, 2015).

Debido a su papel en la compactación y desarrollo del blastocisto, la disminución del área luminal en la gestación y la adhesión del trofoblasto al epitelio luminal uterino, se deduce que la alteración en sus patrones y/o niveles de expresión podría resultar en una fertilidad reducida.

3.5 Uniones estrechas

Como ya se ha mencionado, parte de la transformación de la membrana plasmática es la modificación de las estructuras de unión que están asociadas al tercio superior de la membrana plasmática lateral de las CELU. Estas uniones se conocen como uniones estrechas.

Las uniones estrechas o “tight junctions” (TJ) en inglés, son redes proteicas intercelulares que regulan el paso de solutos por vía paracelular e imparten

polaridad a las células epiteliales al separar el dominio basolateral de la membrana plasmática del apical, ya que inhiben la distribución libre de moléculas como lípidos y otras proteínas (Farquhar & Palade, 1963; Schneeberger & Lynch, 1992; Gumbiner, 1993). Estos complejos arreglos compuestos por más de 40 proteínas diferentes, están organizados como un grupo de proteínas transmembranales acopladas a un set de proteínas submembranales que actúan como puentes conectando el complejo al citoesqueleto de actina.

Las TJ son estructuras dinámicas cuya permeabilidad cambia en respuesta a una gran variedad de estímulos externos (Cohen *et al.*, 1985), así sean condiciones fisiológicas normales (Gilula *et al.*, 1976; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2005) o patológicas (Alavi *et al.*, 1983).

3.5.1 Uniones estrechas en el útero de rata durante la gestación temprana

Al observar las proteínas de las uniones estrechas durante el ciclo estral de la rata, se encontró que existía una mayor cantidad en el proestro y en el estro, cuando los niveles de estrógenos y P₄ están en su máximo (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2005). Además, estudios previos de criofractura han demostrado que la complejidad geométrica de las TJ del epitelio luminal uterino se incrementa con el tratamiento con P₄, hormona sumamente influyente en el endometrio uterino en los primeros días de la gestación. Se demostró que altos niveles de estrógenos, como los que existen en el proestro y en el DG1, resultan en una unión estrecha con pocas interconexiones, lo que es congruente con el edema estromal observado en este tiempo. Sin embargo, al momento de la implantación la unión estrecha incrementa tres veces su profundidad a lo largo de la membrana plasmática lateral (Murphy *et al.*, 1993 & 2000a). La estimulación con estrógenos resulta en una unión estrecha de fibras paralelas y una estimulación con P₄ causa que la red proteica se extienda hacia el dominio basolateral de las células y que se generen más interacciones que a su vez son geoméricamente más complejas, lo que resulta en una unión más impermeable como la deseada en el momento de la implantación.

Se han observado cambios en la morfología de las uniones estrechas (TJ) que sugieren que estas se hacen más eficientes en bloquear la vía paracelular para preservar el contenido del fluido uterino luminal en el momento de la implantación (Murphy *et al.*, 1982). Por lo tanto, la función de las TJ en el epitelio luminal uterino parece estar involucrada en controlar el volumen y la composición del fluido luminal en el momento en el que el blastocisto se está desarrollando y adhiriendo (Murphy *et al.*, 1982; Nicholson *et al.*, 2010).

Con respecto al BPA, en un estudio en el que se trató perinatalmente a ratas Wistar con dos dosis diferentes del compuesto (0.05 mg/kg de pc/día o 20 mg/kg de pc/día), se evaluaron diversas proteínas de uniones estrechas en la gestación temprana de las hembras al alcanzar la madurez sexual. Se observaron cambios en la composición de las TJ con ambas dosis, correlacionando con una disminución en el número de sitios de implantación. Las diferencias en los patrones de distribución y niveles de las proteínas de uniones estrechas podrían estar desregulando el transporte paracelular antes, durante y después de la implantación, alterando así la composición del fluido luminal uterino en la gestación temprana, el desprendimiento de las células epiteliales para permitir la penetración del blastocisto y la formación de la barrera estromal que protege al embrión del sistema inmune materno (Martínez-Peña *et al.*, 2017).

3.5.2 Ocludina

La ocludina es una proteína integral de las TJ que está involucrada en la determinación de la permeabilidad epitelial y constituye, junto con las claudinas, los filamentos de las TJ que se observan por criofractura (Tsukita *et al.*, 2001). Tiene 4 dominios transmembranales, dos loops extracelulares ricos en tirosina y glicina, un dominio amino-terminal citoplasmático corto y un dominio carboxilo-terminal citoplasmático muy grande involucrado en la interacción de la ocludina con proteínas de uniones estrechas citoplasmáticas como ZO-1 que interactúan con los filamentos del citoesqueleto (Ando-Akatsuka *et al.*, 1996; Furuse *et al.*, 1993) (Figura 7).

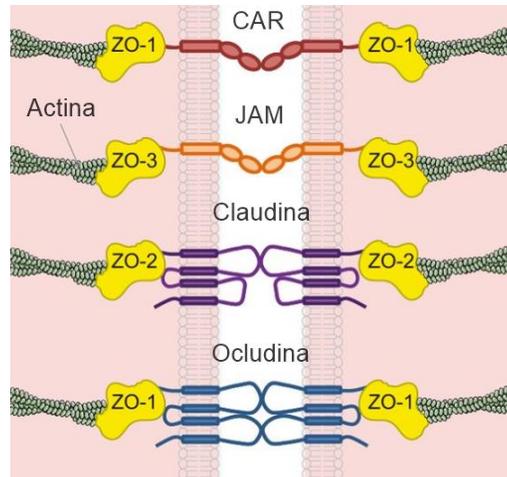


Figura 7. Ocludina en uniones estrechas. Modificado de Mateo *et al.*, 2015.

La ocludina es un gen único que da lugar a muchas variantes obtenidas por procesamiento alternativo (Ghassemifar *et al.*, 2002) y la cantidad de ocludina en un tejido está inversamente relacionada con su permeabilidad. Existe evidencia que demuestra que al aumentar la cantidad de ocludina en las uniones estrechas, aumenta su estabilidad, adhesión y estrechez (Van-Itallie & Andersen, 1997; Leach *et al.*, 2000) y que interactúa con las claudinas para regular la permeabilidad celular (Balda *et al.*, 2000).

3.5.2.1 Expresión de ocludina en el útero de rata durante la gestación temprana

Estudios demuestran que la ocludina no se observa en los primeros días de gestación, sino que aparece con una señal apical en la membrana plasmática lateral de las CELU en el DG6, que es el momento en el que se lleva a cabo la implantación, por lo que se sugiere que juega un papel importante en este proceso (Orchard *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2010).

En un experimento, se estudió la expresión de ocludina en cuatro grupos de ratas. El primer grupo constaba de ratas preñadas (estudiadas a los días 1 y 6 de gestación), el segundo de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos, el tercero de ratas ovariectomizadas tratadas con P₄ y el cuarto de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos y P₄. La señal de ocludina se observó

en todos los grupos a excepción del que únicamente fue tratado con estrógenos, por lo que se deduce que su expresión está regulada por P₄. Se sugirió también que es probable que exista un pool citoplasmático de ocludina que migra en el momento de la implantación hacia las uniones estrechas (Nicholson *et al.*, 2010).

Además de las funciones ya mencionadas, la ocludina se expresa en las células estromales decidualizadas de la zona decidual primaria para formar una barrera que rodea al embrión con la pérdida de las células epiteliales adyacentes. La zona decidual primaria, inducida por el blastocisto, es impermeable a las inmunoglobulinas, lo que sugiere que la expresión de las proteínas de las uniones estrechas inducidas por el trofoblasto forman una barrera temporal en las células de la zona decidual primaria que impide el paso de moléculas dañinas, como las inmunoglobulinas maternas, hacia el embrión (Wang *et al.*, 2004d) y ya que el éxito de un embarazo depende de la protección y el crecimiento del embrión dentro del micro-ambiente uterino, estas proteínas son de suma importancia.

Además, la ocludina se observa en la membrana desde la etapa de mórula tardía (Sheth *et al.*, 2000b). En un estudio en el que se trató a embriones de ratón con anticuerpo contra ocludina, se observó que esta proteína estaba involucrada en el establecimiento de la cavidad del blastocisto y en la regulación de su permeabilidad, por lo que se concluyó que el desarrollo de las uniones estrechas es crítica para la formación del trofoectodermo (Kim *et al.*, 2004).

3.5.2.2 Efecto del BPA sobre la expresión de ocludina

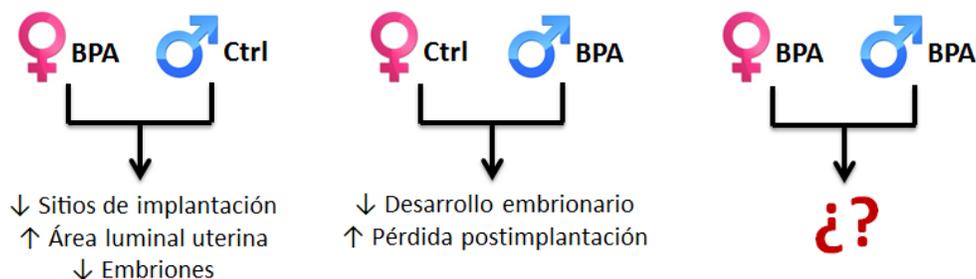
Con respecto a su relación con el BPA, en un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación en el que se trató perinatalmente a ratas con el compuesto, se demostraron alteraciones en la localización y los niveles de ocludina en las CELU de los sitios de implantación (DG6). Estos cambios fueron más significativos en el patrón de distribución que en los niveles proteicos, ya que se observó una señal de ocludina en el citoplasma de las células epiteliales y estromales con la dosis baja, y una apical y nuclear en las células epiteliales con la dosis alta (Martínez-Peña, 2014). De acuerdo con la literatura (Nicholson *et al.*, 2010), en el

momento de la implantación, la ocludina debería observarse en las zonas de las uniones estrechas y ya no presentar señal citoplasmática, por lo que las señales de ambos grupos tratados podrían sugerir que la proteína no migró del citoplasma a la membrana plasmática como sugiere la teoría y por lo tanto las ratas presentaron uniones estrechas más permeables que, como se ha mencionado, no son deseables en el momento de la implantación.

4. Planteamiento del problema

En los últimos años se ha observado un aumento en la infertilidad y en la prevalencia de enfermedades reproductivas en el ser humano, por lo que se han realizado diversos estudios que buscan encontrar una explicación para estos fenómenos. Dentro de los resultados obtenidos, se han señalado a los disruptores endócrinos como posibles sustancias involucradas en el decremento de las tasas de embarazo, ya que estos compuestos exógenos al organismo tienen la capacidad de alterar la homeostasis de los sistemas endócrino y reproductivo tanto de hombres como de mujeres.

Un disruptor endócrino al cual estamos actualmente expuestos, debido a su presencia en empaques alimentarios, es el bisfenol-A, por lo que el estudio de sus efectos sobre el organismo es de suma importancia. Existen estudios en los que se han demostrado las consecuencias sobre la salud reproductiva que tiene la ingesta de este compuesto tanto en la etapa adulta como en etapas críticas del desarrollo, como la gestación y la lactancia, siendo más relevante en estas últimas. Sin embargo, pocos estudios se han especializado en los mecanismos a nivel molecular por los cuales actúa el BPA y el posible efecto aditivo de la exposición de ambos padres al compuesto, por lo que el presente proyecto, además de observar los efectos del BPA sobre algunos parámetros reproductivos en 4 grupos experimentales (hembra control-macho control (♀C-♂C), hembra tratada-macho control (♀B-♂C), hembra control-macho tratado (♀C-♂B) y hembra tratada-macho tratado (♀B-♂B)), se enfocará en el estudio de tres proteínas de adhesión y una de uniones estrechas que son importantes en el proceso de implantación en la rata, tanto en el epitelio luminal uterino como en el blastocisto.



5. Hipótesis

Debido a los efectos conocidos del disruptor endócrino bisfenol-A sobre la homeostasis del sistema endócrino y reproductivo, sobre todo en periodos críticos del desarrollo, se espera observar en las crías de madres tratadas:

- Alteraciones en los niveles y/o patrones de distribución de proteínas de adhesión y de uniones estrechas en el epitelio luminal uterino que correlacionen con un ciclo estral alterado y un menor número de sitios de implantación, y que estas alteraciones sean más evidentes cuando ambos padres han sido expuestos al compuesto.
- Una disminución de los niveles de proteína de adhesión en los blastocistos obtenidos de padres tratados.

6. Objetivo general

Evaluar el efecto de un tratamiento perinatal con el disruptor endócrino bisfenol-A sobre parámetros reproductivos (regularidad del ciclo estral y número de sitios de implantación) en la rata, así como los niveles y la distribución de proteínas de adhesión y uniones estrechas involucradas en la implantación y el efecto sobre la gestación cuando ambos padres han sido tratados.

6.1 Objetivos particulares

Evaluar el efecto del tratamiento durante la gestación y lactancia con la ingesta diaria admisible (IDA) de bisfenol-A (0.05 mg/kg de peso corporal/día) en ratas (F0) sobre:

- A) El tiempo de gestación y el número de crías al nacimiento y al destete.
- B) El peso y la distancia anogenital de la generación F1 al día del destete.
- C) El ciclo estral de las hembras F1 al alcanzar la madurez sexual.
- D) El número de sitios de implantación de la generación F1 para ambos padres control, un padre tratado y uno control (ambas combinaciones) y ambos padres tratados.
- E) Los niveles y patrones de distribución, en la generación F1, de proteínas de adhesión (paxilina, talina y E-cadherina) y de uniones estrechas (occludina) en el epitelio luminal uterino de los sitios de implantación al día 6 de gestación, así como E-cadherina en los blastocistos (F2) al día 5 de gestación para ambos padres control, un padre tratado y uno control (ambas combinaciones) y ambos padres tratados.

7. Metodología

7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron animales (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) del Bioterio Harlan de México de entre 200 y 250 g de peso bajo estrictos controles de periodos luz:oscuridad 12h:12h, a 23 +/- 1°C y humedad relativa de 50%, con agua y comida *ad libitum*, mantenidos en cajas de 45 cm x 24 cm x 20 cm, con un máximo de 5 animales por caja. Este estudio fue aprobado por el comité de ética (CICUAL) de la Facultad de Química con número de protocolo OFICIO/FQ/CICUAL/107/15.

7.2 Monitoreo del ciclo estral y apareamiento

Para el monitoreo del ciclo estral de las 20 ratas iniciales, se tomó un frotis vaginal y se llevó a cabo una tinción con hematoxilina y eosina (H/E) para analizarlo al microscopio. Esta tinción se realizó aplicando directamente hematoxilina sobre el frotis, enjuagando con agua transcurridos 8 minutos y sumergiendo en una solución saturada de carbonato de litio durante unos segundos antes de dejar secar para aplicar eosina durante 3 minutos y finalmente enjuagar con etanol al 70%.

El ciclo estral de la rata dura entre cuatro y cinco días y consta de cuatro etapas (proestro, estro, metaestro y diestro), es decir, aproximadamente una por día, sin embargo en ocasiones la etapa del estro puede durar dos días. De acuerdo con el tipo de células predominante en el frotis, se pudo definir la etapa en la que se encontraba cada rata, ya sea proestro (células redondeadas con un núcleo bien definido teñido de azul y agrupadas en racimos de color violeta), estro (frotis muy abundante de células de descamación que se asemejan a hojuelas con bordes irregulares y sin núcleo que se tiñen de rosa intenso), metaestro (leucocitos de color violeta y mucho más pequeños que el resto de las células) o diestro (sin predominio de algún tipo de célula y de frotis escaso) (Figura 8). Se llevó a cabo esta operación de forma cotidiana con todas las ratas durante al menos dos ciclos regulares antes de proceder con el experimento.

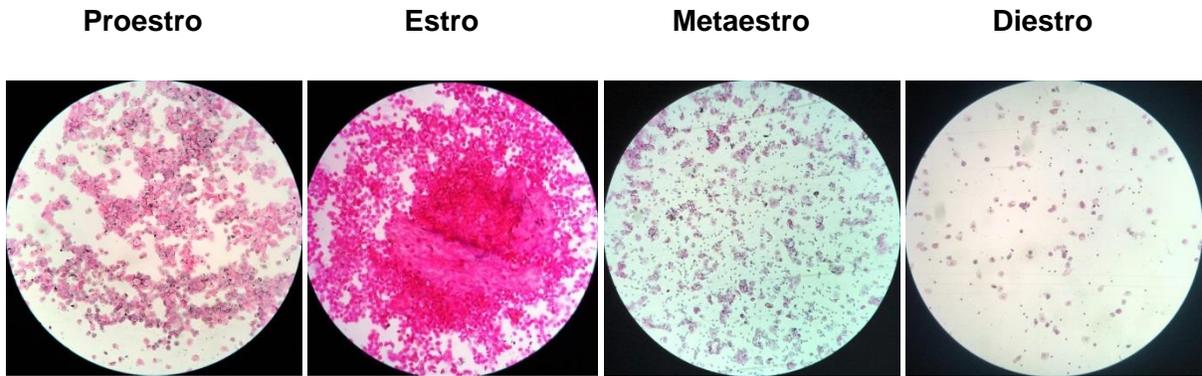


Figura 8. Las cuatro etapas del ciclo estral de la rata. Tinción H/E.

Después de seleccionar a las hembras con ciclos regulares, se procedió a aparearlas. Con base en el monitoreo, se observó el día en el que la hembra era receptiva al macho, se colocó a este último en la caja de la hembra a las seis de la tarde y se removió a las once de la mañana del día siguiente. El frotis de la hembra a aparear debía mostrar un proestro en la mañana de la monta, puesto que es en la etapa del estro cuando es receptiva al macho. Inmediatamente después de remover al macho, se le tomó frotis vaginal a la hembra con el fin de verificar la gestación. El frotis teñido de la hembra debía mostrar espermatozoides el día posterior a la monta para que este día fuera considerado como el día 1 de gestación (DG1) (Figura 9).

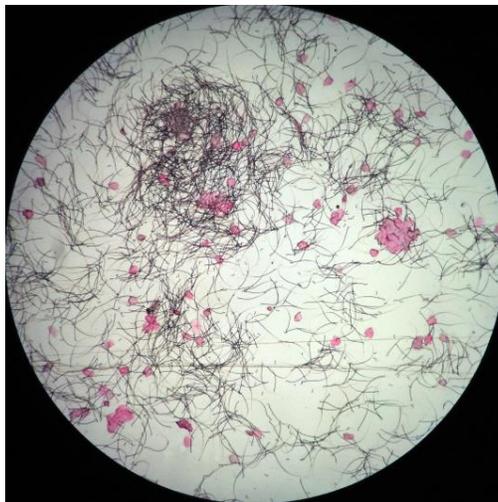


Figura 9. Frotis vaginal de una rata hembra en el primer día de gestación. Se observan células epiteliales cornificadas y espermatozoides. Tinción H/E.

7.3 Tratamiento farmacológico de la generación F0

Una vez verificada la gestación de la rata, se clasificó en alguno de los dos grupos, ya sea control o tratada con BPA. Desde la monta y hasta el día del nacimiento, cada rata se alojó sola en una caja, en donde permaneció con sus crías hasta el día del destete. Durante los primeros días de gestación, se monitoreó el volumen de ingesta de agua con el fin de ajustar la dosis.

Como ya se mencionó, se decidió utilizar la IDA establecida para el bisfenol-A (0.05 mg /kg de pc al día) debido a que el conocimiento y las regulaciones actuales mencionan que no debería observarse un efecto adverso con ella, sin embargo se ha llegado a cuestionar este dato y la manera de calcularlo y se han observado efectos a dosis equivalentes y más bajas (Kyong *et al.*, 2012; Cabaton *et al.*, 2011; Salian *et al.*, 2009b; Miyawaki *et al.*, 2007; Vandenberg *et al.*, 2012; Vandenberg, 2014).

Para preparar el tratamiento, se consideró el volumen de ingesta de agua así como el peso de cada rata para ajustar la dosis. Se disolvió el BPA en etanol absoluto y esta disolución se agregó al 0.1% al agua de bebida de los animales, que se suministró en botella de vidrio para evitar que compuestos provenientes de botellas de plástico que contuvieran policarbonato interfirieran con los resultados. Se decidió suministrar de esta manera el compuesto ya que por medio de la ingesta es la principal forma de exposición de los humanos al BPA. Así, el grupo control únicamente ingirió agua destilada con etanol al 0.1%. Las hembras preñadas recibieron el tratamiento a partir del DG6 y hasta el día postnatal 21, que corresponde al día del destete de sus crías (Figura 10).

Se eligió esta ventana de exposición debido a que en los estudios de toxicidad para el desarrollo, uno de los principales ensayos *in vivo* de disrupción endócrina propuestos es el ensayo *in utero* + lactancia de desarrollo en el cual se trata a la hembra al menos desde la implantación y se busca estudiar alteraciones reproductivas incluyendo las neuroconductuales, de actividad, hormonales, malformaciones, pubertad, espermatogénesis, etc. (Repetto & Repetto, 2009).

Además de observar posibles efectos en la implantación en esta ventana, se sabe que el sistema nervioso en la rata comienza a inducirse a partir de la gastrulación y, ya que se ha sugerido que el mecanismo de acción del BPA podría ser a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, la administración del compuesto en ese momento podría resultar en efectos observables. En cuanto al sistema reproductivo, la diferenciación de órganos propiamente dicha comienza a partir del DG12 y, a pesar de que la mayor parte de la organogénesis termina a los 15 días, el útero se sigue desarrollando y diferenciando (diferenciación del endometrio, el miometrio y el perimetrio, desarrollo de glándulas endometriales, organización y estratificación de estroma endometrial) dos semanas después del nacimiento (Dunlap *et al.*, 2011; Medlock *et al.*, 1995), por lo que la exposición en ese periodo a un disruptor endócrino podría resultar en consecuencias irreversibles y a largo plazo.

7.4 Caracterización fenotípica de la generación F1

Para cada camada se registró el número de días de gestación, el número de crías nacidas vivas y muertas y el número de crías vivas al día del destete. Este último día, es decir, el día postnatal 21, se separó a la madre de su camada, se sexaron las crías y se separaron machos de hembras. Cada cría fue pesada y se determinó su distancia anogenital (DAG). Se les marcó y colocó agua libre de BPA y comida *ad libitum* para dejarlas alcanzar la madurez sexual.

7.5 Evaluación de parámetros reproductivos (F1)

Una vez alcanzada la madurez sexual (más de 3 meses de edad), se monitoreó nuevamente el ciclo estral de las hembras F1 con el fin de comparar la regularidad de las hembras tratadas con las hembras control. De igual manera y con base en el monitoreo del ciclo, se procedió a aparear a las hembras de la generación F1 con machos F1 de tal manera que se generaron los cuatro grupos experimentales ya mencionados: hembra control-macho control (♀C-♂C), hembra tratada-macho control (♀B-♂C), hembra control-macho tratado (♀C-♂B) y hembra tratada-macho

tratado (♀B-♂B). Ninguna de las parejas estaba emparentada para evitar el efecto de otro tipo de factores sobre la fertilidad.

Al DG6, las hembras recibieron una inyección intravenosa de 350 µL de una solución al 0.5 % de azul de Evans en solución salina fisiológica (NaCl 0.15 M) treinta minutos antes de ser sacrificadas, de manera que al observar el útero, los sitios de implantación se tiñeron con el colorante debido a su amplia vascularización y fueron fácilmente identificables. Se sacrificaron por decapitación cinco hembras al DG6 para cada uno de los cuatro grupos. Las ratas fueron anestesiadas antes del sacrificio.

7.6 Obtención de blastocistos (F2)

Se sacrificaron hembras preñadas a las 17:00 horas del DG5, cuando los blastocistos no se han implantado aún pero la mayoría ha perdido su zona pelúcida, que es una capa de glicoproteínas que lo protege en las etapas tempranas de gestación e impide su implantación prematura. Se extrajeron los cuernos uterinos y se lavaron con buffer de fosfatos PBS (NaCl 0.137 M, KCl 0.00268 M, Na₂HPO₄ 0.01014 M, KH₂PO₄ 0.00176 M; pH 7.4) para recolectar los blastocistos con el fin de realizar ensayos de inmunofluorescencia.

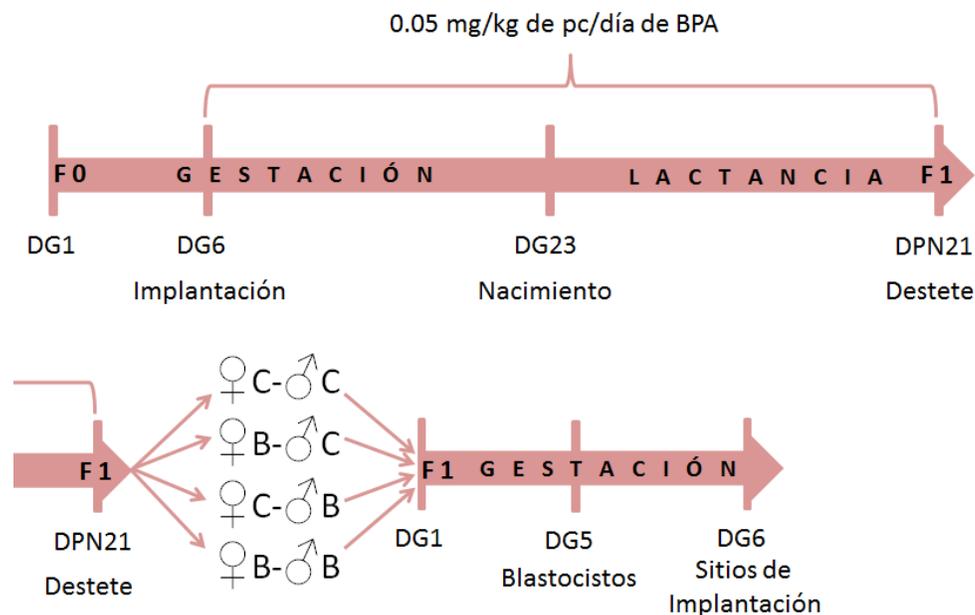


Figura 10. Diseño experimental del proyecto. DPN: día postnatal.

7.7 Procesamiento de los tejidos

Se obtuvo, en el momento del sacrificio, una muestra de aproximadamente 5 mm de cada sitio de implantación del útero al DG6. Se separaron segmentos para los análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia y para el de Western blot.

Para los ensayos de inmunofluorescencia con cortes en congelación, los segmentos fueron embebidos en un medio crioprotector ("Tissue Freezing Medium" de Jung) dentro de un tubo eppendorf y sumergidos en hexano superenfriado con hielo seco para ser almacenados en un Revco a -70°C . Posteriormente, las muestras fueron cortadas con un criostato KEDEE modelo KD-2850 y estos cortes de 8 μm fueron transferidos a portaobjetos previamente tratados con poli-L lisina (50 μg de poli-L lisina/mL de tris-HCl 10 mM, pH 8.0). Para este tratamiento, los portaobjetos fueron limpiados con una gasa impregnada con etanol al 96 % 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. Las muestras fueron tratadas al vacío durante 30 minutos y almacenadas en un Revco a -70°C para su posterior análisis.

Para los ensayos con cortes en parafina, las muestras fueron fijadas con una solución al 4 % de paraformaldehído en PBS durante 2 horas y posteriormente se lavaron con una solución de PBS. Se procesaron estas 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 que fueron cortados (5 μm) con un microtomo Leica modelo RM2145 y transferidos a portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina como ya se mencionó.

Para el análisis de Western blot, los segmentos fueron almacenados en un buffer de lisis a -70°C para su posterior análisis.

7.8 Estudio de los niveles de proteína

7.8.1 Ensayo de Inmunofluorescencia

7.8.1.1 Cortes en congelación

Para los cortes en congelación de los sitios de implantación, las muestras fueron tratadas 10 minutos al vacío antes de ser sumergidas durante 3 minutos en acetona en hielo. Después de un baño de 5 minutos en PBS, se sumergieron durante 10 minutos en Tritón x-100 al 0.25% en PBS y posteriormente se les dieron otros tres baños de 5 minutos en PBS. Después, se les agregó albúmina al 0.5% en PBS durante 30 minutos antes de dejarlas incubando con el anticuerpo primario en albúmina al 0.5% en PBS durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron preparados de acuerdo con las sugerencias del fabricante: Mouse anti-Integrin β 3/GTX40146 de GeneTex a 1.1 mg/mL (intervalo de dilución 1:50-1:500), Mouse anti-Integrin β 3/SC-365679 de Santa Cruz Biotechnology a 200 μ g/mL (intervalo de dilución 1:50-1:500), Rabbit anti-Integrin β 3/SC-14009 de Santa Cruz Biotechnology a 200 μ g/mL (intervalo de dilución 1:50-1:500), Goat anti-Integrin β 3/SC-6627 de Santa Cruz Biotechnology a 200 μ g/mL (intervalo de dilución 1:50-1:500), Rabbit anti-Talin/SC-15336 de Santa Cruz Biotechnology a 200 μ g/mL (dilución 1:50), Rabbit anti-Paxillin/SC-5574 de Santa Cruz Biotechnology a 200 μ g/mL (dilución 1:50), Mouse anti-E-cadherin/610181 de BD Biosciences a 250 μ g/mL (dilución 1:100) y Mouse anti-Occludin/331500 de Life Technologies a 100 μ g/200 μ L (dilución 1:100). Al día siguiente, las muestras recibieron tres lavados de 10 minutos en PBS y se dejaron incubando con el anticuerpo secundario 1:100 en PBS (Donkey anti-Goat acoplado a FITC/705-095-147 de Jackson ImmunoResearch, Goat anti-Rabbit acoplado a Alexa Fluor[®]488/A-11034 de Invitrogen y Donkey anti-Mouse acoplado a FITC/715-095-151 de Jackson ImmunoResearch) durante dos horas a temperatura ambiente. Tras otros tres baños de 10 minutos en PBS, se montaron

las muestras agregando medio de montaje para fluorescencia adicionado con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol).

El ensayo de inmunofluorescencia tiene como fin obtener una señal de manera que sea posible observar la localización y distribución de las proteínas de interés en el tejido, así como comparar la proporción de cada una de ellas en los distintos grupos experimentales, ya que una señal más intensa corresponde, en general, a una mayor cantidad de proteína. Además de la evaluación empírica de este parámetro, es posible llevar a cabo una cuantificación densitométrica para distinguir diferencias en los niveles de la proteína de interés entre los grupos experimentales. En el presente proyecto, esta cuantificación fue llevada a cabo con el programa ImageJ[®], analizando los cortes de los 5 animales de cada grupo. Para ello, se omitió la señal del DAPI, se delimitó de manera manual la región celular a evaluar (apical, lateral o basal) y se obtuvieron de 2 a 6 valores de densidad óptica por corte. Estos valores fueron promediados de manera que se obtuvo un solo valor de densidad óptica por animal. Se consideraron los valores de los 5 animales en el análisis estadístico. Cabe destacar que el análisis de la región lateral de las CELU fue ligeramente distinto al de las regiones apical y basal, ya que mientras que las señales apical y basal fueron continuas a lo largo de la membrana plasmática de las CELU, los valores de densidad óptica lateral obtenidos incluyeron también la región citoplasmática media de las células.

7.8.1.2 Cortes en parafina

Se desparafinaron las muestras a 60°C durante 20 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 colocaron media hora 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. Transcurrida la

media hora, se agregó el anticuerpo primario 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, se agregó el anticuerpo secundario en PBS y se dejó incubar durante 2 horas. 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. Se utilizaron los mismos anticuerpos que en el ensayo con cortes en congelación en los mismos intervalos de dilución.

7.8.1.3 Blastocistos

Inmediatamente después de ser recolectados del útero con PBS, los blastocistos fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos. Después de un baño de 5 minutos en PBS, los blastocistos se trataron con Tritón x-100 al 1% en PBS por 10 minutos y recibieron otro lavado de 5 minutos con PBS. Posteriormente, fueron tratados con BSA (albúmina sérica bovina) al 0.5 % en PBS durante 10 minutos y por último, se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario en Tritón x-100 al 1% en PBS. Al día siguiente, después de un lavado de 5 minutos con PBS, se agregó el anticuerpo secundario y se dejó incubando durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Por último, tras otro baño de 5 minutos en PBS, se montaron las muestras agregando medio de montaje para fluorescencia adicionado con DAPI. Para este ensayo se utilizaron los mismos anticuerpos que en los ensayos en útero a las mismas concentraciones.

Al igual que con los cortes de útero, se llevó a cabo una cuantificación densitométrica de la señal obtenida con los ensayos de inmunofluorescencia de los blastocistos. De igual manera, se utilizó el programa ImageJ® y se analizaron todos los blastocistos de los cuatro grupos experimentales de manera individual. La fluorescencia de todos los ensayos se examinó y se capturó la imagen con un microscopio confocal (Olympus FV1000). Para los controles negativos de todos los ensayos, se omitió el anticuerpo primario.

7.8.2 Ensayo de inmunohistoquímica revelado con diaminobencidina (DAB)

Como ya se describió, los cortes de los tejidos incluidos en parafina, se desparafinaron y rehidrataron, se sumergieron en citrato de sodio 10 mM a pH 6 durante 10 minutos en horno de microondas en dos ocasiones y, tras lavar con PBS, se bloqueó la peroxidasa endógena colocándolos en H₂O₂ al 3% en PBS durante media hora antes de ser permeabilizados durante otra media hora en Tritón x-100 al 0.5% en PBS. Seguido de dos lavados en PBS, se les colocó albúmina al 5% en PBS adicionado con H₂O₂ al 1% durante media hora y se agregó el anticuerpo primario en Tritón x-100 al 3% en PBS para incubarlo toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se utilizaron los mismos anticuerpos anti-Integrina β3 que en los ensayos de fluorescencia en los mismos intervalos de dilución. Al día siguiente, tras otros dos lavados con PBS, se agregó el anticuerpo secundario y se amplificó la señal con el complejo Avidina-Biotina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PK-6101 Rabbit IgG Vectastain ABC Kit[®], PK-6102 Mouse IgG Vectastain ABC Kit[®] y PK-6105 Goat IgG Vectastain ABC Kit[®]). Finalmente, se reveló con el kit de diaminobencidina (DAB) y peroxidasa “DAB Peroxidase (HRP) Substrate kit” SK-4100 de Vector Laboratories y se montó con Organo/limonene mount.

7.8.3 Extracción de proteína y Western Blot

Los sitios de implantación fueron cortados longitudinalmente y raspados con un bisturí de manera que se obtuvo únicamente el epitelio luminal uterino. Estas muestras fueron homogeneizadas en buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas (Complete Ultra Tablets (Roche)) utilizando un sonicador (3 minutos: 30 on, 20 off a 35% de amplitud) y un método mecánico con jeringa de insulina (30 pases). Los homogeneizados fueron centrifugados a 14,000g durante 20 minutos a 4°C con el fin de remover el material insoluble. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su posterior análisis. El contenido proteico se determinó con el ensayo para proteínas de Bio-Rad Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con una curva patrón de BSA.

Una vez cuantificada la proteína de las muestras, se procedió a tomar el volumen de cada una de ellas equivalente a 30 µg de proteína y se homogeneizó (4:1) con buffer de carga Laemmli 5X. Estas alícuotas fueron calentadas a 92°C durante 5 minutos y separadas por electroforesis en un gel SDS-PAGE cuya concentración dependía del tamaño de la proteína blanco (10% para ocludina de 65 kDa y 8% para E-cadherina de 120 kDa). Posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) utilizando un sistema de transferencia húmedo en frío (Bio-Rad Laboratories). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada en polvo al 10% en TBS-T (NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Tris-base 0.019 M, Tween 20 1:1000; pH 7.6) y al terminar se incubaron con el anticuerpo primario a temperatura ambiente durante toda la noche. Para las proteínas de interés, se utilizaron los mismos anticuerpos que en los ensayos de inmunofluorescencia con diferentes diluciones: Mouse anti-E-cadherin/610181 de BD Biosciences a 250 µg/mL (dilución 1:250) y Mouse anti-Occludin/331500 de Life Technologies a 100 µg/200 µL (dilución 1:500). Al día siguiente, tras tres lavados de 10 minutos con TBS-T, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario preparado en TBS-T durante dos horas a temperatura ambiente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Goat anti-Rabbit acoplado a peroxidasa/SC-2004 de Santa Cruz Biotechnology a 200 µg/0.5 mL (dilución 1:8300) y Goat anti-Mouse acoplado a peroxidasa/SC-2005 de Santa Cruz Biotechnology a 200 µg/0.5 mL (dilución 1:5000). Finalmente, tras otros tres lavados de 10 minutos con TBS-T, las membranas fueron reveladas con DAB y peróxido de hidrógeno y escaneadas con el fin de realizar un análisis densitométrico. Se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como estándar interno (Rabbit anti-GAPDH/SC-25778 de Santa Cruz Biotechnology a 200 µg/mL utilizado en una dilución 1:5800), por lo que los resultados se expresan como una relación entre la proteína de interés y GAPDH (37 kDa) con el fin de corregir el error de carga de cada muestra. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards/161-0375 de Bio-Rad.

La cuantificación densitométrica de las membranas se llevó a cabo con el programa Image Studio 4.0 de LI-COR Biosciences. Para ello, se delimitaron manualmente las bandas obtenidas en cada muestra para la proteína interés y el estándar interno de manera que el área cuantificada fuera igual en todas las muestras de la membrana. Una vez obtenido el valor densitométrico de cada banda, se procedió a dividir el valor de la banda de la proteína de interés entre el valor de la banda del estándar interno de la misma muestra. Estos cocientes fueron los datos tomados en cuenta para el análisis estadístico.

7.9 Análisis de los datos

El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo por medio de los programas Prism[®], Microsoft Excel[®], ImageJ[®], Image Studio 4.0[®], Adobe Photoshop[®] y FV10-ASW1.7[®].

Se realizaron ya sea ANOVAs de un factor seguidos de una prueba de Dunnett o una prueba de T no pareada de dos colas con el fin de saber si existía diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre las ratas control y las tratadas con BPA.

8. Resultados

8.1 Días de gestación y número de crías de la generación F0.

Se monitoreó el nacimiento de las crías de cada rata y se registró el número de días de gestación a los cuales nacieron. De igual manera, se cuantificaron las crías de cada camada al nacer y al día del destete y se realizó un análisis estadístico con el fin de conocer si existía diferencia significativa entre los grupos. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Días de gestación y número de crías del grupo control y del grupo tratado con BPA.

Tratamiento	Días de gestación (Promedio \pm D.E.)	Diferencia significativa	Número de crías al nacimiento (Promedio \pm D.E.)	Diferencia significativa	Número de crías al destete (Promedio \pm D.E.)	Diferencia significativa
Control	23.00 \pm 0	No	9.85 \pm 2.54	No	9.57 \pm 2.57	No
BPA	23.20 \pm 0.42		10.50 \pm 3.1		10.11 \pm 3.26	

D.E.: desviación estándar.

Mientras que las nueve camadas control nacieron al día 23 de gestación, dos de las diez camadas tratadas con BPA nacieron a los 24 días y todas fueron desde 8 hasta 14 crías por camada. No se encontró diferencia significativa entre las medias del número de crías nacidas vivas, el número de crías al día del destete ni los días de gestación a los cuales nacieron.

8.2 Aumento de la DAG al día del destete de la generación F1

En la figura 11 se muestran las gráficas correspondientes al análisis comparativo entre el grupo control y el grupo tratado con BPA con respecto a la relación entre la distancia anogenital (DAG) y el peso al día del destete de los machos y las hembras F1. Se muestra como barra de color negro en la parte superior de los datos la desviación estándar de cada grupo. Para obtener estas gráficas se dividió la DAG de cada cría en mm entre la raíz cúbica de su peso en gramos de acuerdo con lo propuesto por Gallavan *et al.* (1999), ya que el aumento del peso corporal se comporta como una función cúbica, mientras que el de la DAG es lineal.

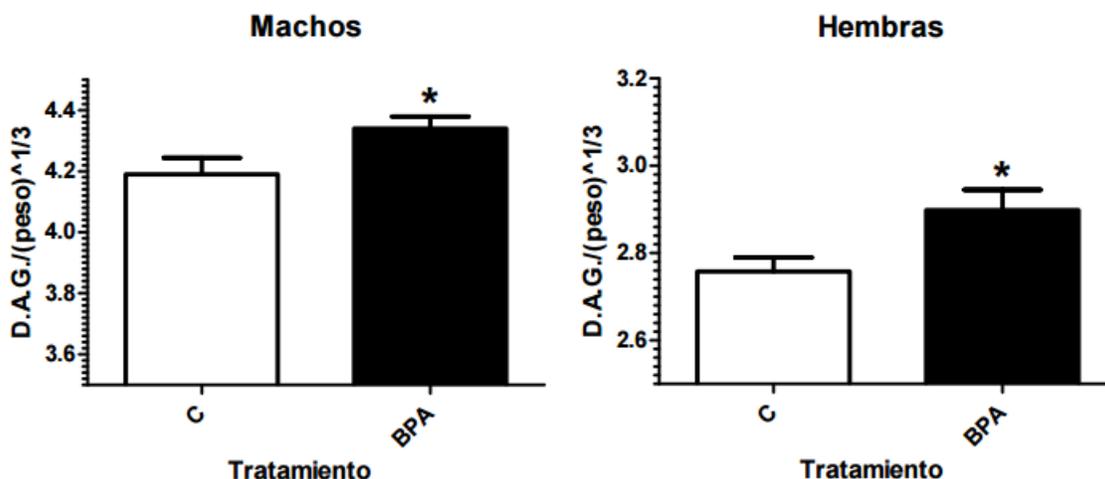


Figura 11. Análisis comparativo de la relación $D.A.G./\sqrt[3]{\text{peso}}$ para machos y hembras F1 al día del destete. * $p < 0.05$ vs control, prueba de T.

Se observó un aumento significativo en la media del grupo tratado con BPA con respecto al control, tanto en machos como en hembras. Estos resultados indican un posible efecto del compuesto sobre los mecanismos que regulan, en etapas tempranas, el desarrollo de los órganos sexuales.

8.3 Alteración de parámetros reproductivos de F1

8.3.1 Irregularidad del ciclo estral de las hembras F1

Una vez alcanzada la madurez sexual, se monitoreó el ciclo estral de las hembras F1 con el fin de determinar la regularidad hormonal y las características citológicas de su ciclo. Mientras que el 94.7% (N=38) de las hembras control presentó un ciclo estral regular, ya sea de cuatro o cinco días, únicamente el 82.97% (N=48) de las hembras tratadas con BPA mostró un ciclo regular. Las hembras irregulares del grupo tratado mostraron ya sea un diestro persistente, una transición de proestro a estro persistente o un estro persistente (más de 3 días seguidos).

8.3.2 Disminución del número de sitios de implantación

Como ya se mencionó, al DG6 las hembras fueron inyectadas con una solución de azul de Evans treinta minutos antes de ser sacrificadas de manera que al observar el útero, los sitios de implantación se tiñeron con el colorante debido a su amplia

vascularización y fueron fácilmente identificables como protuberancias violetas (Figura 12).

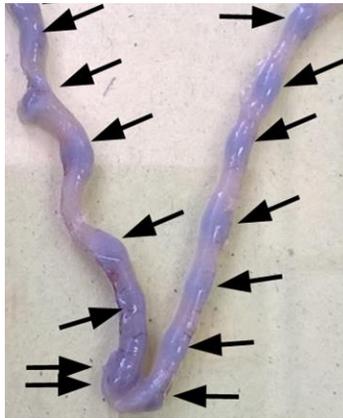


Figura 12. Útero de rata control en el DG6 teñido con azul de Evans. Las flechas señalan los sitios de implantación.

Así, se cuantificaron por inspección visual los sitios de implantación de cada animal. La figura 13 muestra la gráfica correspondiente al análisis comparativo entre los cuatro grupos experimentales para este parámetro.

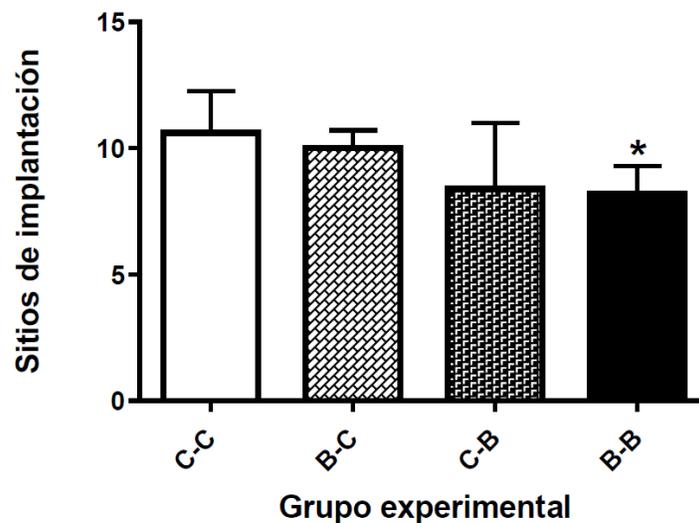


Figura 13. Análisis comparativo del número de sitios de implantación de cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B). * $p < 0.05$ vs control, prueba de T.

Como puede observarse, se encontró una disminución en el número de sitios de implantación en los tres grupos tratados con respecto al control, siendo esta más notable en ambos grupos con el macho tratado y alcanzando una diferencia

estadística significativa en el grupo con ambos padres tratados. Esto podría sugerir un mayor efecto sobre la fertilidad cuando ambos padres han sido tratados.

8.4 Alteración de niveles y distribución de proteínas en el epitelio luminal uterino

8.4.1 Integrina $\beta 3$

Con el fin de observar la distribución y cuantificar la señal proteica de integrina $\beta 3$ en el útero, se realizaron diversos ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia bajo distintas condiciones. Sin embargo, a pesar de haber realizado el ensayo con cuatro anticuerpos primarios diferentes de dos laboratorios independientes, utilizando diluciones que abarcaron todo el intervalo propuesto por los fabricantes, tanto con cortes en congelación como con cortes en parafina, ni el ensayo de inmunofluorescencia ni el revelado con DAB mostraron una señal proteica clara y consistente de integrina $\beta 3$, por lo que se procedió a analizar dos proteínas estrechamente relacionadas con ella.

Como se mencionó en los antecedentes, talina y paxilina son proteínas de adhesiones focales que interactúan de forma directa e indirecta, respectivamente, con las integrinas y el citoesqueleto. Particularmente, talina colocaliza e interactúa directamente con integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ y está involucrada en su activación, mientras que paxilina está involucrada en la señalización mediada por integrinas y la relocalización de complejos de adhesión celular.

8.4.2 Talina

En la figura 14 se muestra un ensayo de inmunofluorescencia con corte en congelación de un sitio de implantación (DG6). El epitelio luminal uterino se observa como una monocapa de células alineadas adyacentes a un espacio libre de células que corresponde a la luz uterina. En el lado opuesto de la monocapa se encuentra el estroma, que se observa como un conjunto irregular de células.

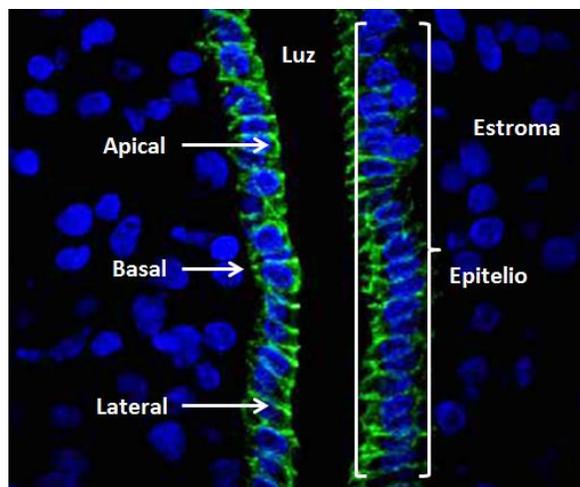


Figura 14. Ensayo de inmunofluorescencia con corte en congelación de sitio de implantación (DG6). Se observan en azul los núcleos celulares y en verde la señal proteica.

Se muestran en la figura 15 cortes en congelación representativos de los 5 animales de cada grupo experimental en el ensayo de inmunofluorescencia para talina. Puede apreciarse que en los cuatro grupos la señal proteica estuvo presente de manera predominante en la región apical de las CELU. Además, tanto en el grupo ♀B-♂C como en el ♀B-♂B se observó señal en la región lateral de las células, siendo más notable en el grupo de ambos padres tratados, y señal en la región basal, siendo más notable en el grupo de hembra tratada y macho control.

Se realizó también una cuantificación densitométrica de la señal proteica de talina en las regiones apical y basal de las CELU de todos los cortes de los 5 animales de cada grupo experimental. En la figura 16 se muestran las gráficas correspondientes al análisis comparativo entre los cuatro grupos experimentales.

La gráfica de la señal apical mostró una tendencia opuesta entre el grupo ♀B-♂C, en el que la talina aumentó con respecto al control, y el grupo ♀C-♂B, en el que disminuyó de manera estadísticamente significativa. El grupo ♀B-♂B no mostró una clara diferencia con respecto al control. La gráfica de la señal basal mostró una tendencia similar a la apical, es decir, un aumento en el grupo ♀B-♂C, una disminución en el grupo ♀C-♂B y una media similar entre el grupo ♀B-♂B y el control. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la media de los grupos tratados y la del grupo control.

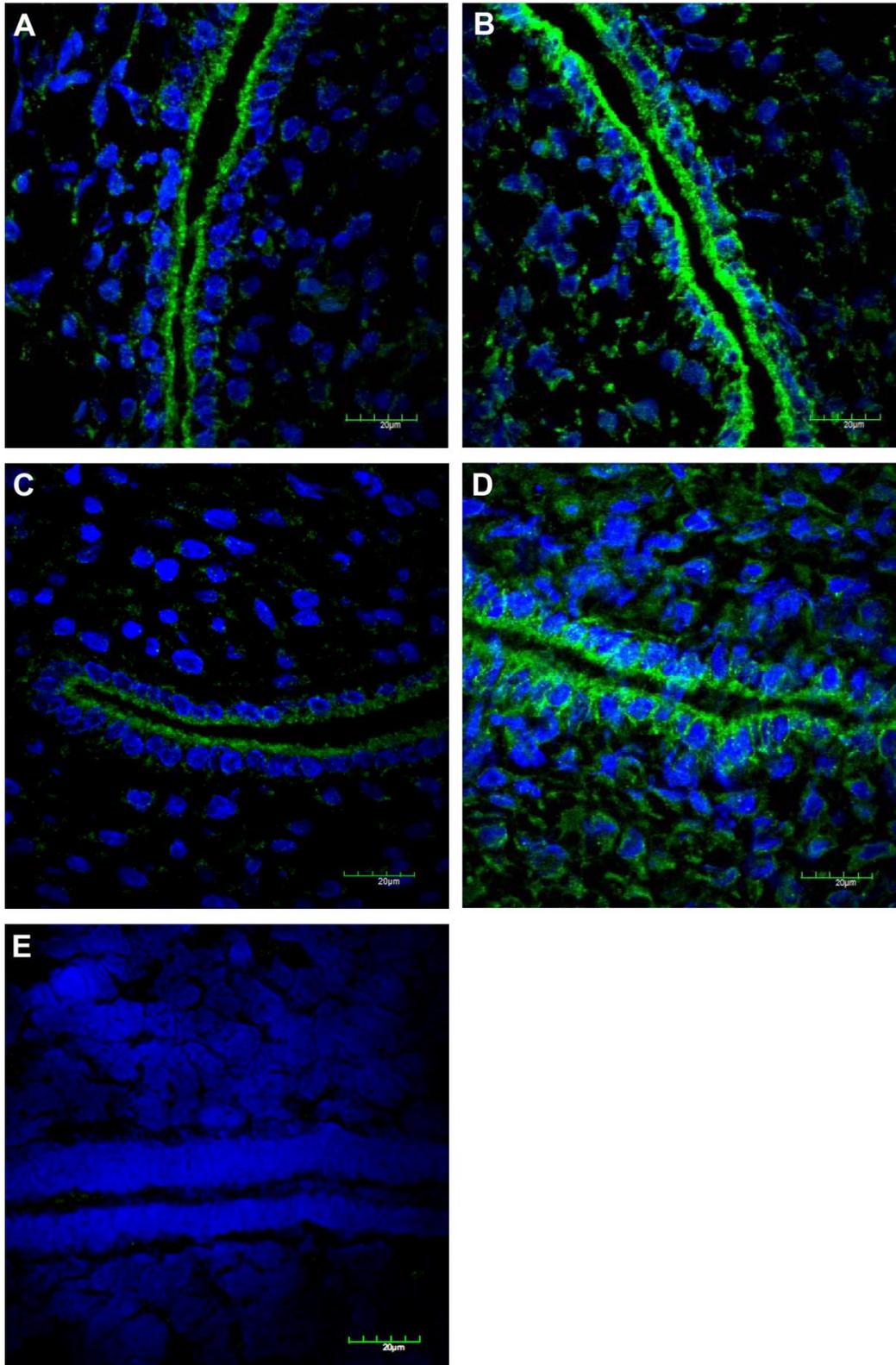


Figura 15. Detección de talina en los sitios de implantación (DG6) del útero de hembra control-macho control (A), hembra tratada-macho control (B), hembra control-macho tratado (C) y hembra tratada-macho tratado (D). N=5. Barra=20 µm. Control negativo (E).

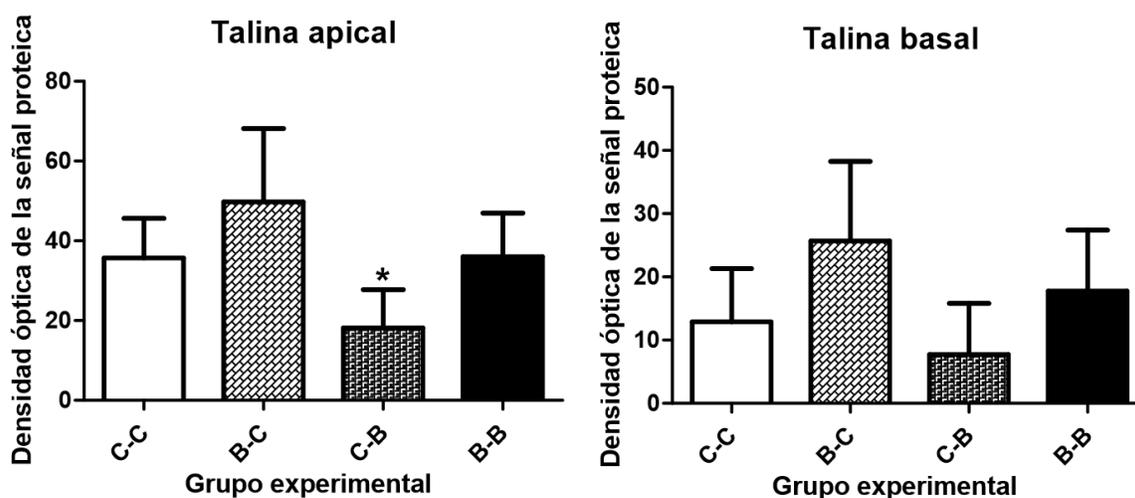


Figura 16. Cuantificación densitométrica de la señal de talina en las regiones apical y basal de las CELU de cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B). * $p < 0.05$ vs control, prueba de T.

Adicionalmente, las gráficas de las cuantificaciones densitométricas permitieron comparar la intensidad de la señal apical con la de la señal basal de cada grupo de forma individual, ya que se determinaron de manera idéntica. Se dividió el valor promedio de densidad óptica apical entre el valor promedio de densidad óptica basal de cada grupo experimental con el fin de conocer si existían diferencias en cuanto a la distribución de la proteína en el epitelio (Tabla 2).

Tabla 2. Relación densidad óptica apical:basal de talina en las CELU de los cuatro grupos.

Grupo experimental	Densidad óptica apical media	Densidad óptica basal media	Relación densidad óptica apical:basal
♀C-♂C	35.724	12.883	2.77
♀B-♂C	49.759	25.673	1.94
♀C-♂B	18.428	7.020	2.63
♀B-♂B	36.063	17.776	2.03

Se pudo observar que en los cuatro grupos experimentales la señal apical de talina fue mayor que la basal, sin embargo, la relación entre estas dos señales

(apical:basal) fue distinta entre grupos, siendo de $\sim 2.7:1$ en los grupos ♀C-♂C y ♀C-♂B y de $2:1$ en los grupos ♀B-♂C y ♀B-♂B, lo que indica un cambio en la distribución de la proteína en ambos grupos con la hembra tratada.

8.4.3 Paxilina

En la figura 17 se muestran cortes en congelación representativos de los sitios de implantación de los 5 animales de cada grupo experimental para el ensayo de inmunofluorescencia para paxilina. Al igual que se observó en los resultados de talina, los cuatro grupos experimentales presentaron una señal predominantemente apical. Sin embargo, se observó además una señal basal en los tres grupos con padres tratados siendo más notable en los grupos ♀B-♂C y ♀C-♂B. Tanto el grupo ♀B-♂C como el ♀B-♂B presentaron además una señal mucho más difusa y extendida en el citoplasma de las CELU y el grupo ♀B-♂C presentó una señal estromal adicional.

Las gráficas de la cuantificación densitométrica de la señal de paxilina en las regiones apical y basal de todos los cortes de los 5 animales de cada grupo se muestran en la figura 18. A pesar de no denotar diferencia estadística significativa, las gráficas mostraron una tendencia similar entre la cuantificación de paxilina y la de talina. Tanto en la gráfica de cuantificación apical como en la de cuantificación basal se observó un aumento en la señal proteica del grupo ♀B-♂C con respecto al control, una ligera disminución en el grupo ♀C-♂B y una media similar entre el grupo ♀B-♂B y el grupo ♀C-♂C.

Al obtener la relación entre el valor promedio de densidad óptica apical y el valor promedio de densidad óptica basal fue posible notar que, al igual que con talina, en los cuatro grupos experimentales la señal apical fue más intensa que la basal. Sin embargo, en este caso la relación entre estas dos señales fue muy similar en los cuatro grupos experimentales ($\sim 2:1$), siendo ligeramente menor en el grupo ♀B-♂C ($\sim 1.8:1$) (Tabla 3). Estos resultados indican que no existió un cambio notable en la distribución de paxilina en las CELU.

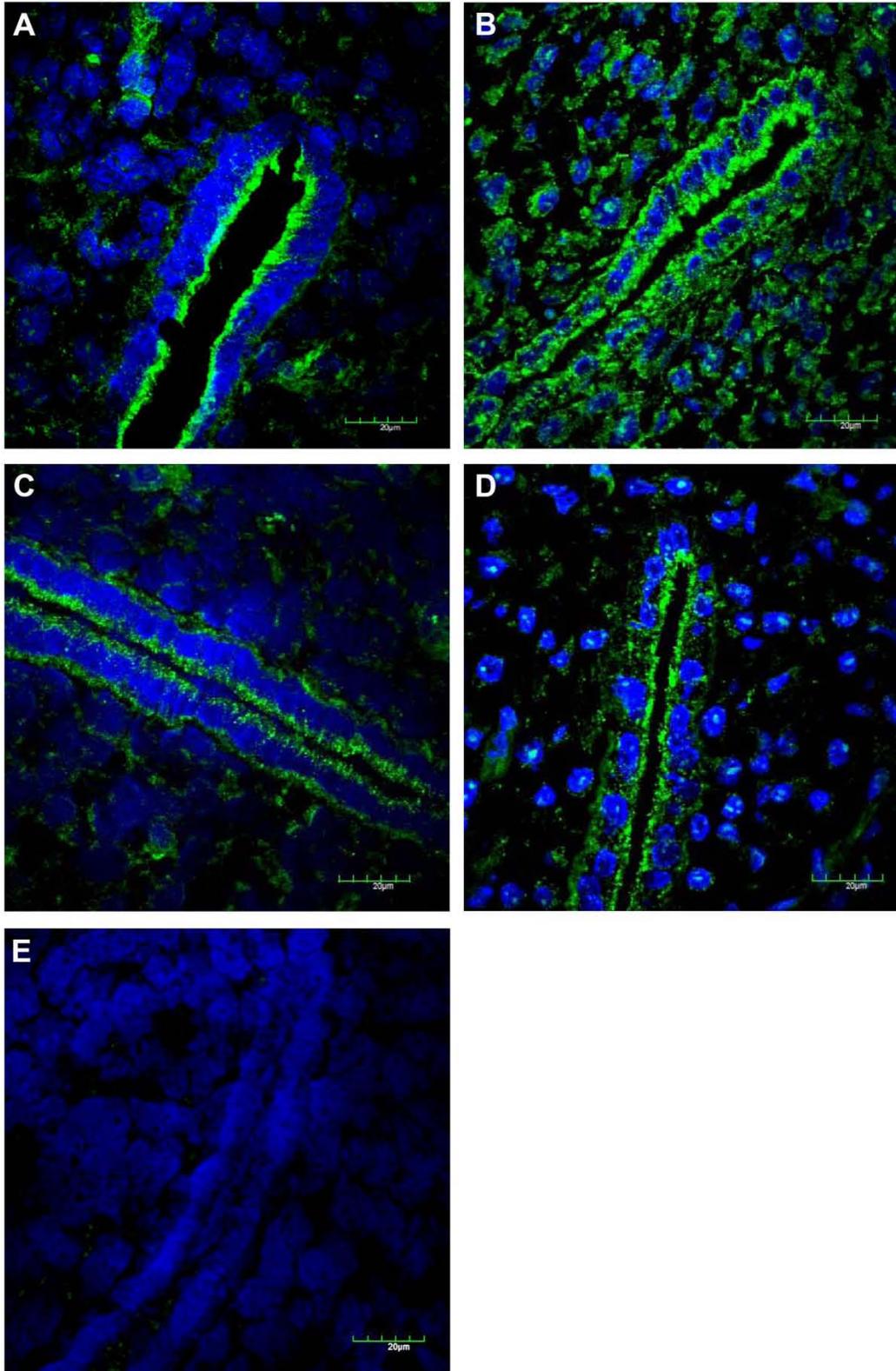


Figura 17. Detección de paxilina en los sitios de implantación (DG6) del útero de hembra control-macho control (A), hembra tratada-macho control (B), hembra control-macho tratado (C) y hembra tratada-macho tratado (D). N=5. Barra=20 µm. Control negativo (E).

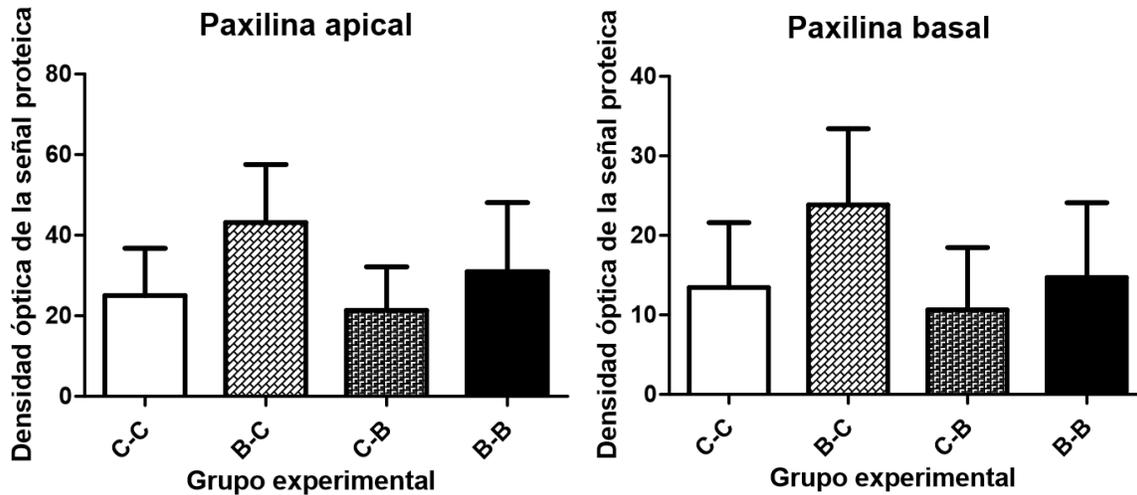


Figura 18. Cuantificación densitométrica de la señal de paxilina en la regiones apical y basal de las CELU de cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B).

Tabla 3. Relación densidad óptica apical:basal de paxilina en las CELU de los cuatro grupos.

Grupo experimental	Densidad óptica apical media	Densidad óptica basal media	Relación densidad óptica apical:basal
♀C-♂C	25.039	13.134	1.91
♀B-♂C	43.172	23.854	1.81
♀C-♂B	21.336	10.643	2.01
♀B-♂B	30.992	14.706	2.11

8.4.4 E-cadherina

Se muestran en la figura 19 cortes en congelación representativos de los 5 animales de cada grupo experimental en el ensayo de inmunofluorescencia para E-cadherina. Como se observa, en los cuatro grupos fue posible notar una señal apical en la membrana plasmática de las CELU. Esta señal fue más intensa en la región intercelular, por lo que en algunas regiones del epitelio fue posible apreciar una discontinuidad. Además, en los tres grupos con padres tratados pudo observarse una señal lateral adicional, siendo más notable en los dos grupos con el macho tratado. En los cuatro grupos se apreció además una señal proteica muy leve en la membrana basal.

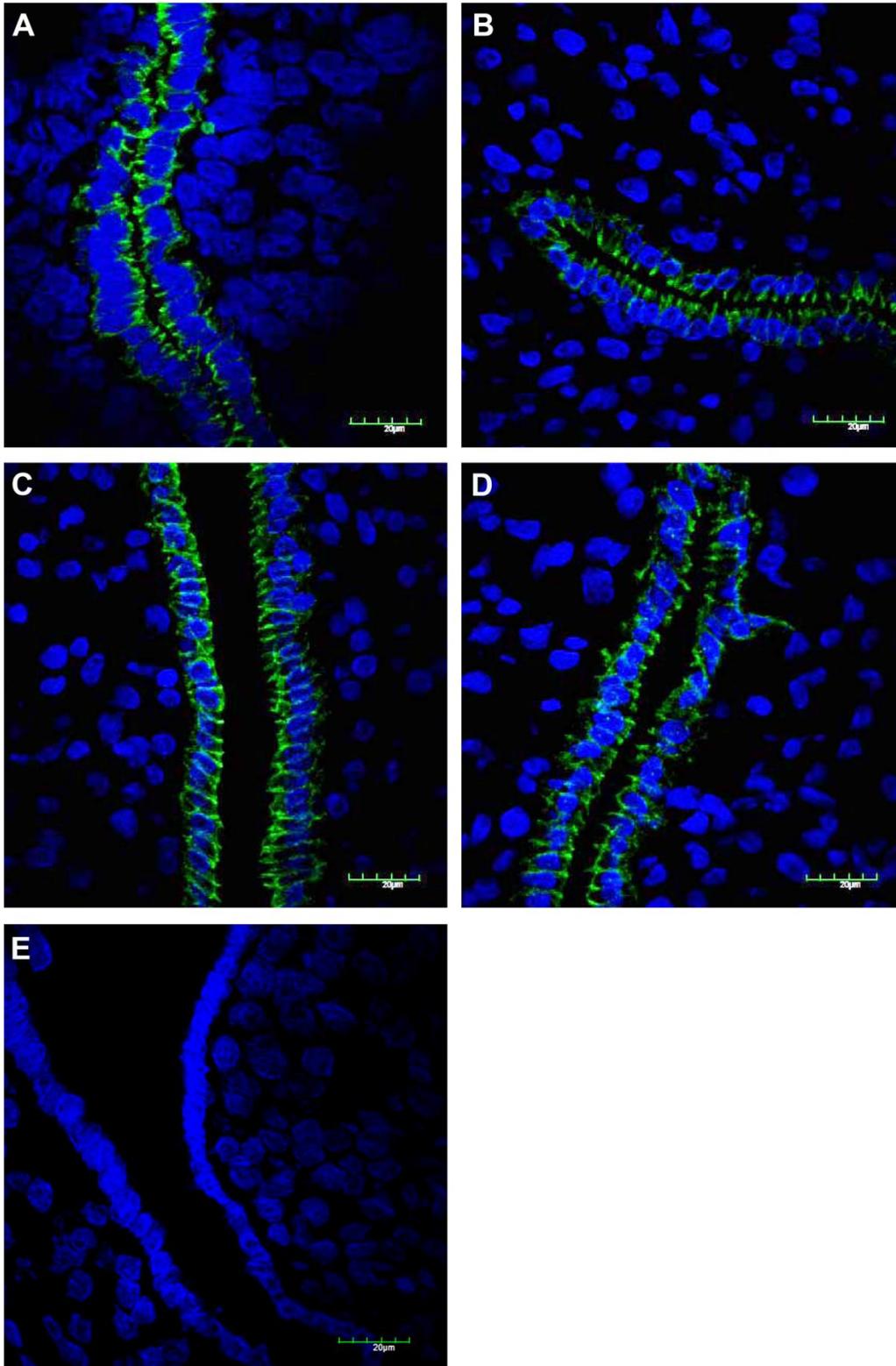


Figura 19. Detección de E-cadherina en los sitios de implantación (DG6) de hembra control-macho control (A), hembra tratada-macho control (B), hembra control-macho tratado (C) y hembra tratada-macho tratado (D). N=5. Barra=20 μ m. Control negativo (E).

Los resultados de la cuantificación densitométrica de E-cadherina en las regiones apical y lateral de la membrana plasmática de las CELU en los cortes de los 5 animales de cada grupo experimental se muestran en la figura 20. Como es posible observar, la señal apical de E-cadherina tendió a disminuir en los grupos con animales tratados con respecto al control, sin embargo únicamente el grupo con ambos padres tratados mostró una reducción estadísticamente significativa. De acuerdo con la gráfica de la cuantificación lateral, se halló una mayor cantidad de E-cadherina en los dos grupos con el macho tratado. Sin embargo, ninguno de los dos grupos presentó un aumento estadísticamente significativo con respecto al control.

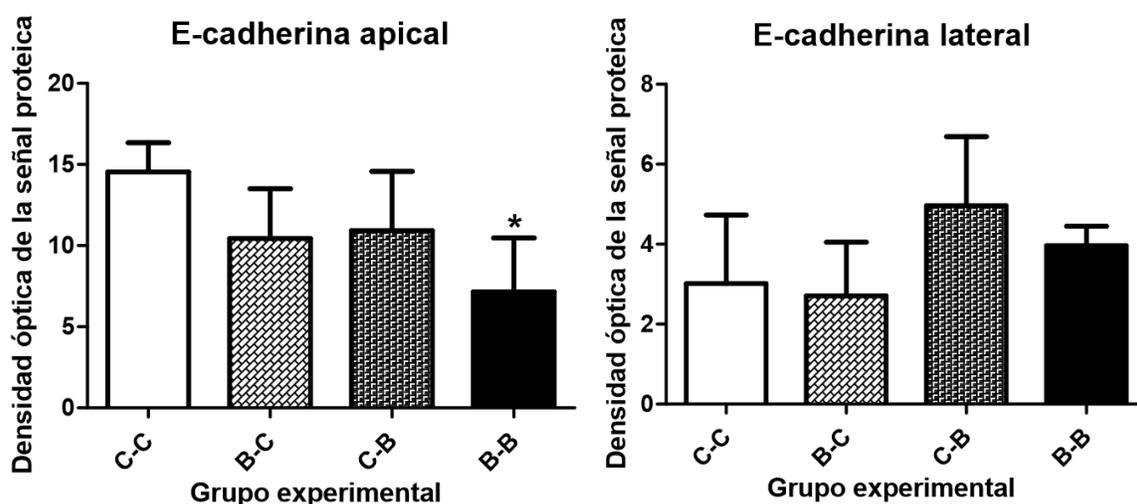


Figura 20. Cuantificación densitométrica de E-cadherina en las regiones apical y lateral de la membrana plasmática de las CELU de cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B). * $p < 0.05$ vs control, prueba de Dunnett.

Como ya se mencionó, en este caso los valores densitométricos de la señal apical y lateral no fueron directamente comparables debido a que se realizaron de manera ligeramente distinta, sin embargo, sí fue posible comparar la relación entre ambos valores de cada grupo experimental con el control. Así, se determinó que en los tres grupos con animales tratados, el cociente de la densidad óptica de la señal apical de E-cadherina entre la lateral fue menor con respecto al control. Este

cociente fue menor en el grupo ♀C-♂B que en el grupo ♀B-♂C y aún menor en el grupo ♀B-♂B (Tabla 4). Al igual que con talina, las diferencias entre estos cocientes indican que existieron cambios en la distribución de E-cadherina en los grupos con animales tratados, siendo más evidentes en ambos grupos con el macho tratado.

Tabla 4. Relación densidad óptica apical:lateral de E-cadherina en las CELU de los cuatro grupos.

Grupo experimental	Densidad óptica apical media	Densidad óptica lateral media	Relación densidad óptica apical:lateral
♀C-♂C	14.543	3.014	4.83
♀B-♂C	10.443	2.710	3.85
♀C-♂B	10.921	4.964	2.20
♀B-♂B	7.165	3.965	1.81

Se decidió realizar un ensayo adicional de Western blot con el fin de comparar y/o confirmar los resultados obtenidos por inmunofluorescencia. Para ello, se realizaron pruebas que permitieron obtener la banda de 120 kDa correspondiente a E-cadherina para las muestras de los 5 animales de cada grupo (Figura 21).

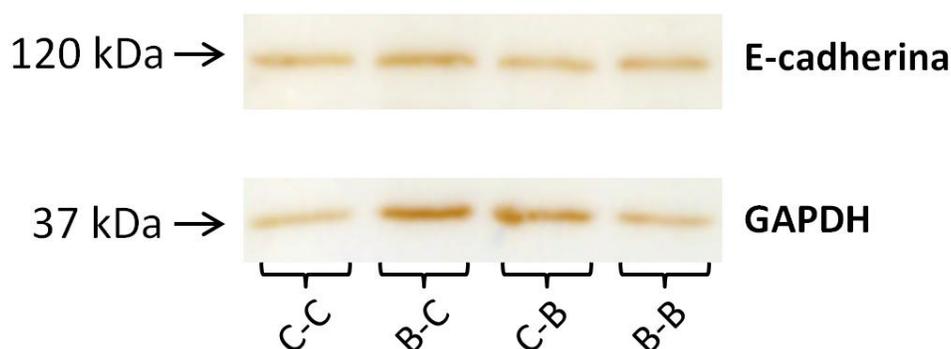


Figura 21. Membrana representativa de los Western blots realizados para la cuantificación de E-cadherina en las CELU de los cuatro grupos experimentales: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B).

De igual manera, se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas y se llevó a cabo una comparación estadística representada en la figura 22. Se utilizó GAPDH como estándar interno debido a que es una enzima de expresión

constitutiva, es decir, cuyos niveles no sufren alteraciones significativas en diferentes estados celulares. Para realizar la gráfica, los valores de densitometría de los western blots de los animales control de cada membrana fueron normalizados a 1 y los valores de los demás grupos fueron comparados con este valor.

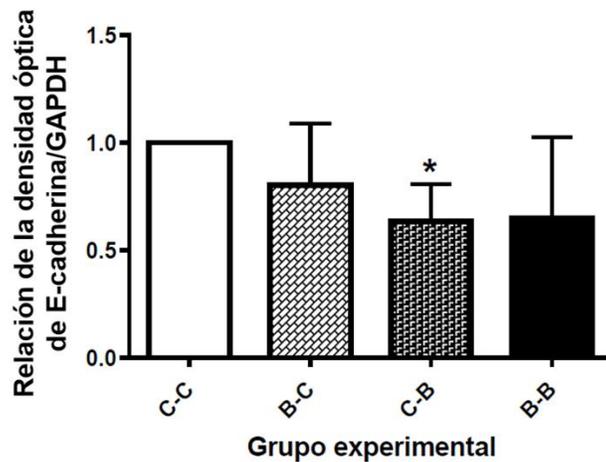


Figura 22. Cuantificación de E-cadherina por Western blot en las CELU de cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B). N=5. * $p < 0.05$ vs control, prueba de T.

Al igual que en la cuantificación densitométrica apical de los ensayos de inmunofluorescencia, la de los ensayos de Western blot reveló una menor cantidad de E-cadherina en el epitelio luminal uterino de los tres grupos con animales tratados. Esta reducción fue más notable en ambos grupos con el macho tratado, sin embargo, únicamente el grupo de ♀C-♂B presentó una reducción estadísticamente significativa.

8.4.5 Ocludina

Se muestran en la figura 23 cortes en congelación representativos de los 5 animales de cada grupo experimental en el ensayo de inmunofluorescencia para ocludina. Como puede apreciarse, se observó una señal proteica apical y puntual en la membrana plasmática de las CELU, ya que en el DG6 la ocludina está presente en las uniones estrechas, localizadas en la región apical intercelular del epitelio luminal uterino (Orchard *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2010).

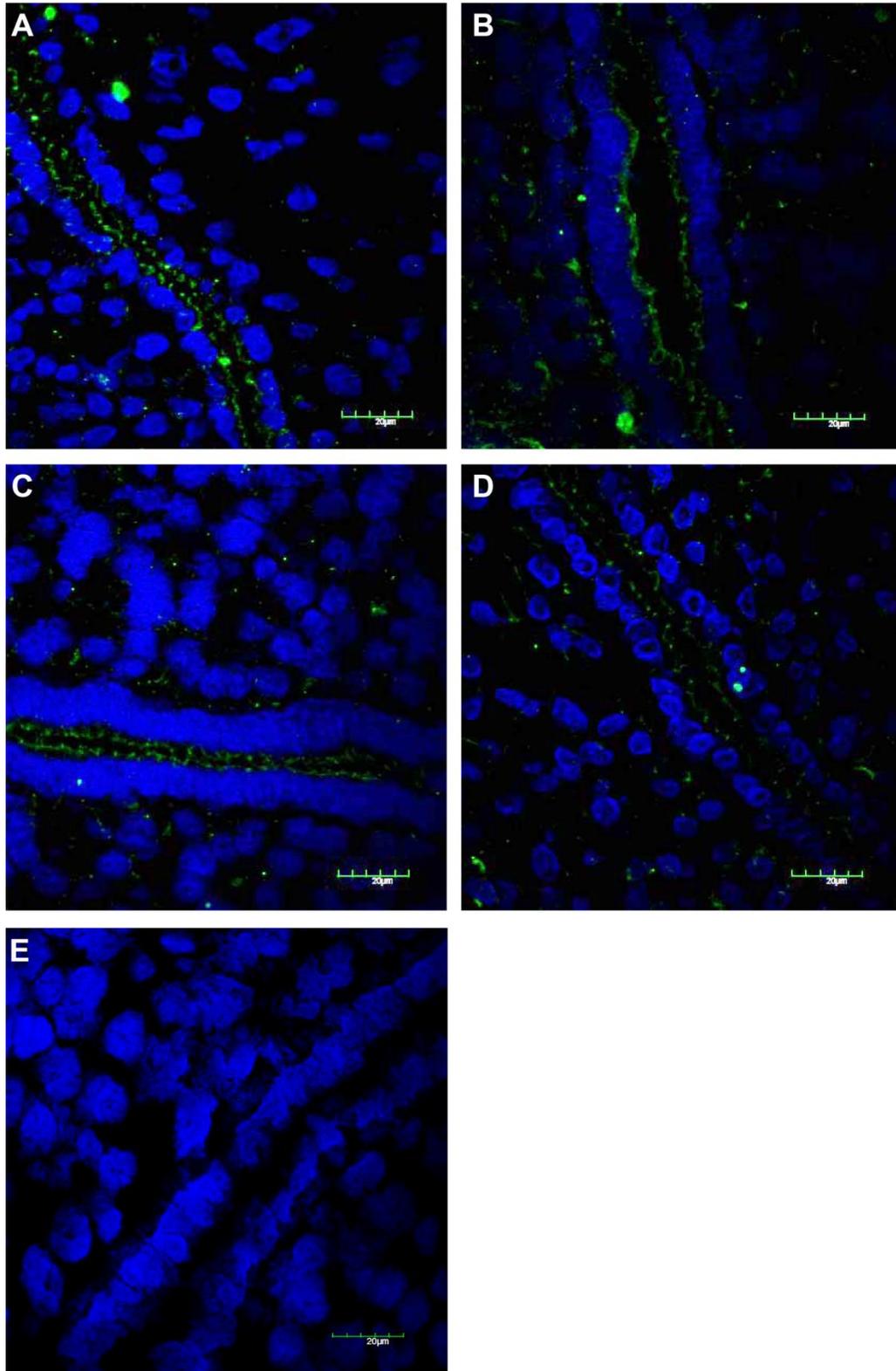


Figura 23. Detección de ocludina en los sitios de implantación (DG6) del útero de hembra control-macho control (A), hembra tratada-macho control (B), hembra control-macho tratado (C) y hembra tratada-macho tratado (D). N=5. Barra=20 µm. Control negativo (E).

No se observó una diferencia significativa en cuanto a la localización o distribución de la proteína entre los cuatro grupos experimentales, por lo que únicamente se realizó la cuantificación densitométrica de la señal apical de los cortes de los 5 animales de cada grupo con el fin de comparar la intensidad de la señal entre ellos (Figura 24).

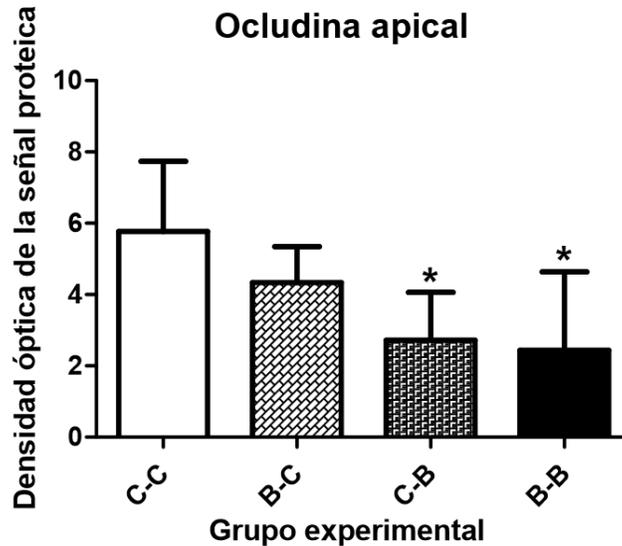


Figura 24. Cuantificación densitométrica de la señal de ocludina en la región apical de la membrana plasmática lateral de las CELU de cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B). * $p < 0.05$ vs control, prueba de Dunnett.

Al igual que con E-cadherina, se observó una disminución de la señal apical de ocludina en los tres grupos con animales tratados. Además, esta disminución fue más notable y estadísticamente significativa en ambos grupos con el macho tratado.

Se realizó un ensayo adicional de Western Blot para comparar y/o confirmar los resultados observados por inmunofluorescencia. Se obtuvo una banda de 65 kDa correspondiente a ocludina para los 5 animales de los cuatro grupos experimentales (Figura 25). Se llevó a cabo una cuantificación densitométrica de estos resultados y una comparación estadística entre los valores de los cuatro grupos experimentales. (Figura 26).

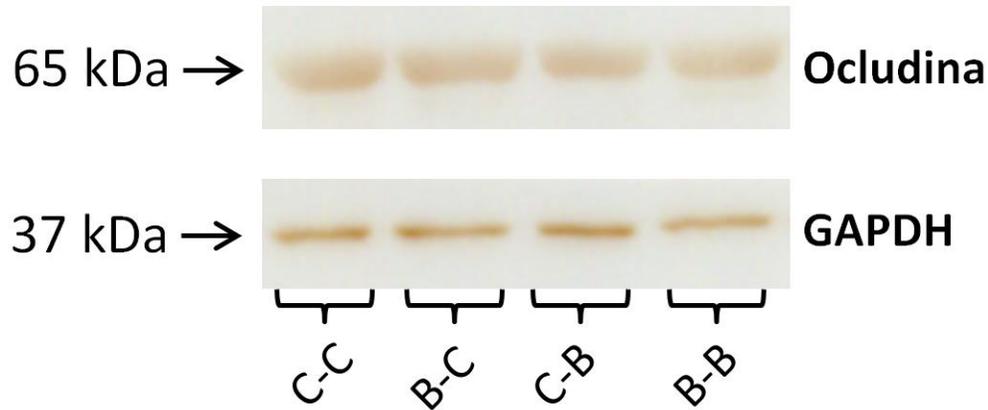


Figura 25. Membrana representativa de los Western blots realizados para la cuantificación de ocludina en las CELU de los cuatro grupos experimentales: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B).

El análisis de Western blot reveló una disminución en la cantidad de ocludina en el epitelio luminal uterino de ambos grupos con macho tratado, sin embargo, únicamente el grupo de ♀C-♂B presentó una reducción estadísticamente significativa, ya que la del grupo ♀B-♂B fue muy pequeña. El grupo ♀B-♂C mostró un comportamiento similar al del grupo control. Al igual que para E-cadherina, los valores de los controles de cada membrana fueron normalizados a 1.

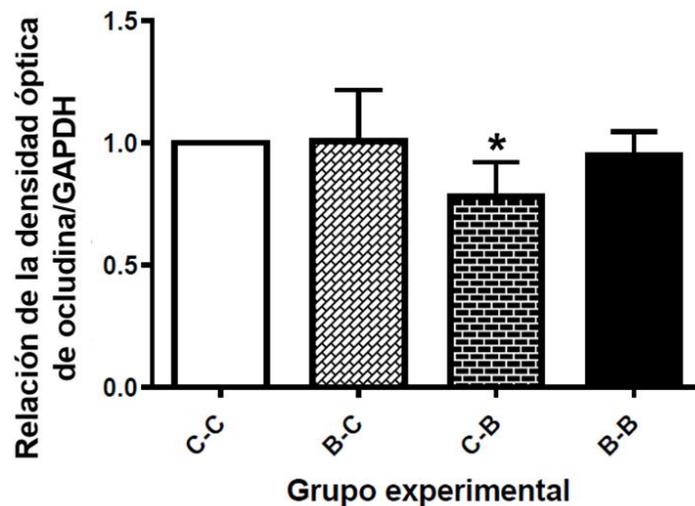


Figura 26. Cuantificación de ocludina por Western blot en las CELU cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C), hembra tratada-macho control (B-C), hembra control-macho tratado (C-B) y hembra tratada-macho tratado (B-B) N=5. * $p < 0.05$ vs control, prueba de T.

8.5 Disminución de E-cadherina en el blastocisto

Además de los ensayos de inmunofluorescencia llevados a cabo con los sitios de implantación de los animales de cada grupo, se realizó este mismo ensayo con los blastocistos obtenidos al DG5, ya que la disminución en el número de sitios de implantación en los grupos con padres tratados podría deberse tanto a alteraciones en el útero como a alteraciones en el embrión, tomando en cuenta que estudios previos reportaron no haber observado un cambio en las tasas de ovulación tras un tratamiento con BPA (Berger *et al.*, 2010; Varayoud *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2010; Martínez-Peña, 2014).

Se decidió realizar este ensayo para E-cadherina debido a su importancia en la compactación, viabilidad, desarrollo y capacidad de implantación de los blastocistos (Thomas *et al.*, 2004; Larue *et al.* 1994; Riethmacher *et al.* 1995). Además, ya que Borman *et al.* (2015) reportaron haber observado una disminución en la expresión de esta proteína en el útero al tratar a los animales con BPA, era posible que existiera también un efecto sobre ella en el blastocisto.

En la figura 27 se muestran imágenes representativas de los blastocistos obtenidos de cada grupo. Como se puede observar, la señal de E-cadherina se presentó a lo largo de la membrana plasmática en el espacio intercelular de los blastocistos de los cuatro grupos. No se observó una clara diferencia en cuanto a la distribución o localización de la proteína entre los grupos experimentales, sin embargo, el 40% de los blastocistos del grupo ♀B-♂B no presentó la morfología típica ovoide de un blastocisto al DG5 como los de los otros tres grupos, sino que presentó una morfología atípica e irregular.

Con base en esto y así como con los ensayos de inmunofluorescencia en útero, se llevó a cabo un análisis densitométrico de la señal proteica obtenida con los ensayos realizados en los blastocistos de cada grupo experimental con el fin de comparar la intensidad de la señal de E-cadherina presente en cada uno de ellos (figura 28).

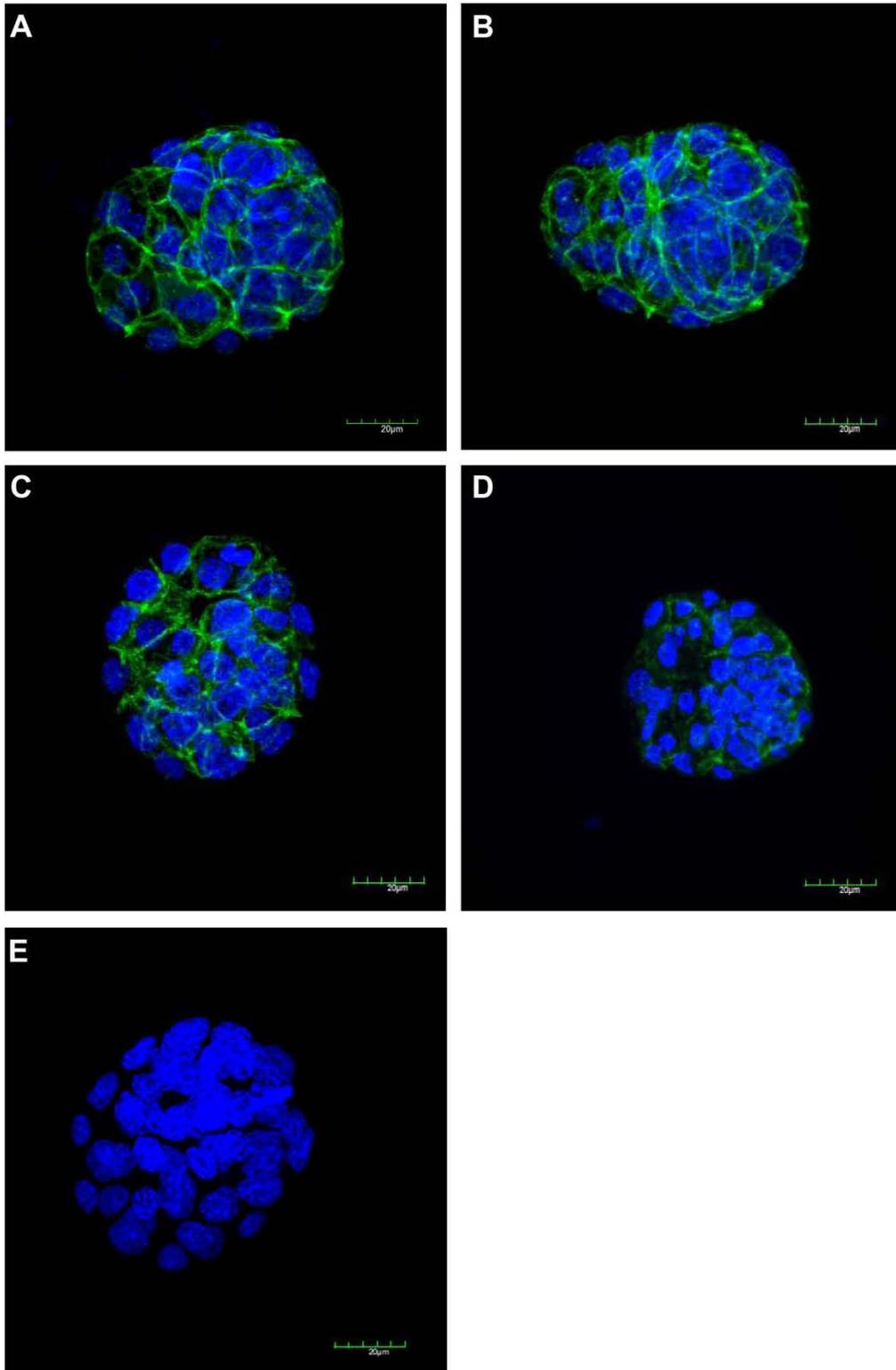


Figura 27. Detección de E-cadherina en los blastocistos obtenidos del útero (DG5) de los animales de cada grupo experimental: hembra control-macho control (A) N=6, hembra tratada-macho control (B) N=6, hembra control-macho tratado (C) N=4 y hembra tratada-macho tratado (D) N=5. Barra=20 µm. Control negativo (E).

La cuantificación densitométrica de los ensayos de inmunofluorescencia reveló una menor intensidad de señal de E-cadherina en los blastocistos de ambos grupos con macho tratado, siendo esta disminución estadísticamente significativa en el grupo ♀B-♂B.

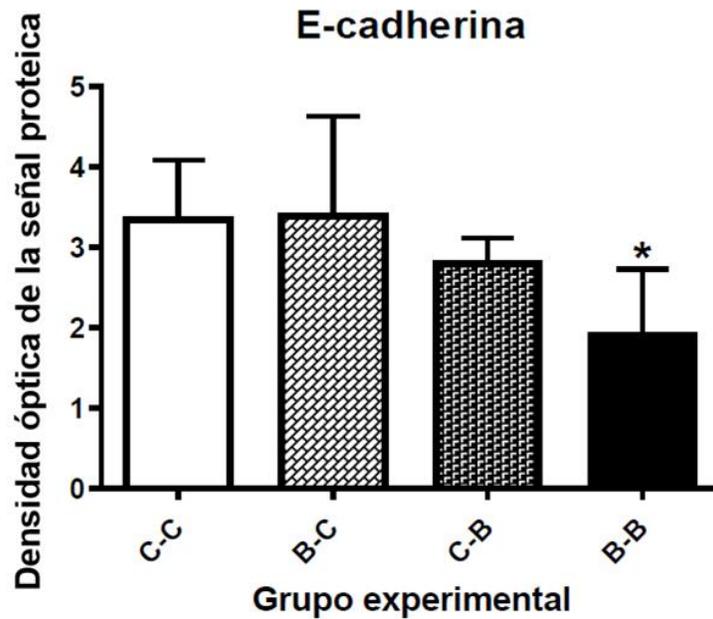


Figura 28. Cuantificación densitométrica de la señal de E-cadherina en los blastocistos de cada grupo experimental: hembra control-macho control (C-C) N=6, hembra tratada-macho control (B-C) N=6, hembra control-macho tratado (C-B) N=4 y hembra tratada-macho tratado (B-B). N=5. * $p < 0.05$ vs control, prueba de T.

9. Discusión

En el presente proyecto se administró BPA a ratas (F0) preñadas durante la gestación y lactancia y se estudiaron las características de su gestación, así como parámetros de desarrollo sexual y de fertilidad en sus crías (F1).

En cuanto al número de crías F1 nacidas vivas y los días de gestación a los cuales nacieron, los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados en el ya mencionado estudio de Cabaton *et al.* (2011) ya que no se hallaron diferencias en estos dos parámetros al exponer a ratones hembra a BPA durante la gestación. El también ya mencionado estudio de Tachibana *et al.* (2007), sin embargo, sí demostró una reducción en el número de crías tras tratar a ratones hembra con BPA durante la gestación temprana, lo que pone en evidencia los distintos efectos del disruptor dependiendo de la dosis, la vía de administración y la ventana de exposición. Como se mencionó, a pesar de no encontrar diferencia significativa, mientras que todas las camadas control nacieron a los 23 días de gestación, dos de las diez camadas tratadas con BPA nacieron a los 24 días. En concordancia con esta información, el estudio ya mencionado de Xiao *et al.* (2011) mencionó haber observado una gestación más larga al tratar a ratones hembra con BPA durante la gestación temprana.

En cuanto a la DAG de las crías, en el presente proyecto se observó un aumento significativo tanto en hembras como en machos tratados perinatalmente con BPA. Este resultado es inconsistente con el hallado por Kobayashi *et al.* (2002) en el que no se encontró diferencia en la DAG (mm, mm/g, mm/g^{1/3}) al destete de hembras ni de machos al tratar a las madres con 4 y 40 mg de BPA/kg de pc del DG6 al postnatal 20. Kendig *et al.* (2012), sin embargo, observaron un aumento de la DAG (mm) al día postnatal 21 en ratones macho de la generación F1 al tratar tanto a la F0 como a la F1 con una dieta a 0.03 ppm de BPA, poniendo nuevamente de manifiesto la diversidad de efectos del compuesto con respecto al tratamiento de los animales e incluso la manera de analizar los resultados. Cabe mencionar que en un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación (Martínez-Peña *et al.*, 2017) con el mismo tratamiento farmacológico que el

presente proyecto, también se halló un aumento en la DAG de los machos F1 al día del destete. Sin embargo, no se observó esta diferencia en las hembras F1, sugiriendo una mayor sensibilidad de los machos al compuesto.

La DAG está regulada de forma general por los estrógenos en las hembras y por los andrógenos en los machos. Mientras que la acción de los estrógenos resulta en una DAG más pequeña como la observada normalmente en las hembras, la de los andrógenos resulta en una DAG más grande como la observada normalmente en los machos. Tomando esto en cuenta, el aumento en la DAG hallado tanto en los machos como las hembras de la generación F1 no corresponde a un efecto estrogénico sino antiestrogénico. Existen reportes previos de la acción dual del BPA como compuesto estrogénico y antiestrogénico dependiendo de diversos factores (Kundakovic & Champagne, 2011; Rubin, 2011; Gould *et al.*, 1998; Wetherill *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha sugerido que el efecto del BPA es distinto al actuar solo y al actuar en presencia de estrógenos. Aldad *et al.* (2011) reportaron que al exponer a hembras *Chlorocebus sabaues* (mono verde) ovariectomizadas a E_2 , observaron un aumento en la expresión de PR en el útero. Sin embargo, al exponerlas tanto a E_2 como a BPA de manera simultánea, observaron una menor cantidad de PR en el útero en comparación con las tratadas únicamente con E_2 . Además, las hembras tratadas únicamente con BPA presentaron niveles observables de PR que fueron menores a los observados en el tratamiento con E_2 . Un experimento adicional y similar en células Ishikawa (de adenocarcinoma endometrial) confirmó lo observado *in vivo*. Este grupo de investigación propone que el BPA modula los receptores a estrógenos y antagoniza la habilidad de los estrógenos de regular la expresión de PR. Esta información podría explicar los resultados obtenidos, ya que si el BPA impidió la unión de los estrógenos endógenos con sus receptores y por ende la acción de estos complejos como factores de transcripción entre otras funciones, pudo haberse alterado el balance estrógenos/andrógenos permitiendo una mayor acción de los andrógenos sobre el desarrollo de los órganos sexuales.

Con respecto al ciclo estral de las hembras F1, se observaron alteraciones notables que coinciden con lo hallado por Mendoza-Rodríguez *et al.* (2011) en un estudio en el que se le administró BPA en el agua de bebida (10 mg/L) a ratas durante la gestación y lactancia y se observó un alto porcentaje de hembras con ciclo estral irregular en la descendencia. De igual manera, otro estudio (Rubin *et al.*, 2001) en el que se trató oralmente a ratas preñadas con 1.2 mg/kg de pc/día, del DG6 hasta el término de la lactancia, demostró una descendencia con patrones alterados en el ciclo estral. Debido a que el ciclo estral es regulado por hormonas, los resultados sugieren una alteración en la homeostasis del sistema endócrino.

Uno de los resultados más relevantes del presente proyecto fue la disminución en el número de sitios de implantación de la generación F1 en los grupos tratados con respecto al control. Esta disminución fue más notable en los grupos con el macho tratado, siendo estadísticamente significativa en el grupo con ambos padres tratados. Existen varios estudios que relacionan la exposición al BPA con la disminución en el número de sitios de implantación, incluyendo el ya mencionado de Xiao *et al.* (2011). Otro ejemplo es el también ya mencionado estudio de Berger *et al.* (2008) en el que la administración de BPA en la gestación temprana redujo los niveles de P₄, el número de sitios de implantación y aumentó el área luminal. Además de estos, el estudio de Varayoud *et al.* (2011) en el que se administró BPA a ratas en los primeros días postnatales, también reportó una disminución en los sitios de implantación. En cuanto al papel de los machos, el estudio ya mencionado de Salian *et al.* (2009a) en el que se trató neonatalmente a ratas macho (F1) con el compuesto demostró un aumento en la pérdida postimplantación y camadas más pequeñas al ser apareados con hembras sanas. Estos resultados, además de confirmar el efecto del BPA sobre los sitios de implantación, sugieren una contribución a la disminución de este parámetro reproductivo por parte de ambos padres. Es por ello que es congruente observar una mayor disminución en el grupo con ambos padres tratados, lo que estaría en concordancia con el efecto aditivo propuesto en la hipótesis del presente proyecto. Además, debido a que la exposición al compuesto fue *in utero* y durante la

lactancia y los efectos fueron observados en la etapa adulta, mucho tiempo después de haber cesado la exposición, es posible que el BPA haya ocasionado alteraciones en la regulación epigenética de los animales. Esta es una hipótesis que ha tomado fuerza en la última década con respecto al mecanismo de acción del BPA (Bhandari *et al.*, 2014; Kundakovic & Champagne, 2011; Manikkam *et al.*, 2013; Singh & Li, 2012; Wolstenholme *et al.*, 2011; Zama & Uzumcu, 2010), sin embargo, aún no se conocen los detalles precisos del efecto de este compuesto sobre el epigenoma. Se discutirán algunos estudios relacionados con esta posibilidad más adelante.

En relación con los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia en útero, para talina se observó una señal apical en los cuatro grupos experimentales. Esta señal, en el grupo control, coincide con la desintegración de las adhesiones focales basales observada al DG6 (al no observar una señal basal) (Kaneko *et al.*, 2008). Además, se ha llegado a observar una ligera señal apical de talina en las CELU al DG6 (Lindsay *et al.*, 2016). Como se mencionó anteriormente, talina está estrechamente relacionada con integrina $\beta 3$ (Critchley, 2000; Calderwood & Ginsberg 2003; Reddy & Mangale 2003; Kaneko *et al.*, 2011; Nayal *et al.* 2004; Tadokoro *et al.*, 2003; Yamada & Geiger, 1997). Si tomamos en cuenta esta relación, existe una mayor concordancia con los resultados obtenidos, ya que se ha reportado la presencia de integrina $\beta 3$ en la región apical de las CELU en el momento y sitio de la implantación (Srinivasan *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2011).

Además, tanto en el grupo ♀B-♂C como en el ♀B-♂B se observó una señal proteica en la región basal y lateral de la membrana plasmática, siendo más notable la primera en el grupo ♀B-♂C y la segunda en el grupo ♀B-♂B. La presencia de talina en estas regiones de la membrana no es deseable en el momento de la implantación, ya que podría participar en complejos de adhesión con la matriz extracelular o con células adyacentes que no favorecerían el desprendimiento de las células epiteliales ni la penetración del blastocisto hacia el estroma después de la implantación. Adicionalmente, la presencia de talina en la

región basal de la membrana sugiere una desaparición incompleta o tardía de las adhesiones focales en el momento de la implantación.

En cuanto a la intensidad de la señal, tanto la apical como la basal tendieron a aumentar en el grupo con la hembra tratada y a disminuir en el grupo con el macho tratado. Sin embargo, la única diferencia estadísticamente significativa fue la disminución de la señal apical en el grupo ♀C-♂B. El hecho de que ambas señales hayan sido mayores en el grupo ♀B-♂C y menores en el grupo ♀C-♂B indica una mayor y menor cantidad de talina en el epitelio de estos grupos, respectivamente, comparada con el control. Existen estudios que demuestran que el efecto de los disruptores endócrinos puede depender del género del organismo en cuestión, presentando incluso efectos opuestos entre ambos sexos (Miyawaki *et al.*, 2007). Esto podría explicar lo observado e incluso podría sugerirse un producto compensatorio entre los efectos opuestos de ambos padres sobre los niveles de talina, originando la media del grupo ♀B-♂B, la cual fue muy similar al grupo control. Además, al obtener la relación entre la intensidad de la señal apical y la basal de los cuatro grupos, se determinó que mientras ambos grupos con hembras control presentaron una relación muy similar entre ellas (~2.7:1), los otros dos grupos, con hembras tratadas, presentaron una relación menor (~2:1). Con esto puede deducirse que la exposición perinatal de la hembra al BPA tiene un mayor efecto sobre la distribución de talina que la exposición del macho, mientras que la exposición de ambos padres tiene un efecto (opuesto) sobre los niveles de talina en el útero.

Al igual que con talina, los ensayos para paxilina revelaron una señal apical en los cuatro grupos experimentales. Comparando el grupo de ambos padres control con la literatura, es congruente la desaparición de la señal de la región basal de las CELU (desaparición de adhesiones focales), sin embargo no se menciona su presencia en otro sitio en el momento de la implantación sino su reaparición en el día 7 en la región basal (Lindsay *et al.*, 2016). Adoptando el mismo enfoque que con talina, se puede relacionar esta presencia apical con su relación con las integrinas. Se observó además una señal en la región basal de las CELU de los

tres grupos tratados, siendo más notable en el grupo ♀B-♂C. Como se mencionó en la discusión de los resultados de talina, esta localización de paxilina no es deseable en el momento de la implantación ya que podría dificultar el desprendimiento de las CELU al formar complejos de adhesión con la matriz extracelular. Esta observación coincide con la desaparición incompleta o tardía de las adhesiones focales sugerida en la discusión de talina. El grupo ♀B-♂B presentó además una señal proteica citoplasmática mucho más difusa en las CELU. Esto podría sugerir una migración o una localización erróneas de la proteína.

En cuanto a la intensidad de las señales apical y basal, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las dos cuantificaciones. Sin embargo, se observó en ambas la misma tendencia que en las de talina, es decir, un aumento en el grupo con la hembra tratada y una reducción en el grupo con el macho tratado. Nuevamente, el hecho de que ambas señales presentaran un comportamiento similar sugiere que existió un aumento general de paxilina en el epitelio del grupo ♀B-♂C y una reducción general en el del grupo ♀C-♂B. Al obtener la relación entre la intensidad de la señal apical y la basal, no se observaron diferencias claras entre los grupos, ya que todos presentaron una relación apical:basal muy similar (~2:1). Estos resultados sugieren, además de un efecto opuesto entre la exposición de ambos padres sobre los niveles de paxilina, una menor sensibilidad de esta proteína con respecto a talina tanto en la alteración de sus niveles como en la de su distribución.

En conjunto, los resultados de talina y paxilina sugieren que al menos algunas de las proteínas que forman parte de los complejos de adhesión podrían desaparecer de la región basal de la membrana plasmática de las CELU y reaparecer en la región apical en el momento de la implantación. Tomando esto en cuenta, a pesar de que no fue posible comparar los resultados obtenidos con la literatura debido a que no se hallaron estudios que reportaran el efecto del bisphenol-A sobre talina ni paxilina, fue posible compararlos con los reportados para integrina $\beta 3$.

En el estudio ya mencionado de Pan *et al.* (2015) en el que se le administró BPA a ratones hembra en la gestación temprana se observó, junto con un decremento en el número de sitios de implantación, una disminución en la expresión de integrina $\beta 3$ tanto en el endometrio como en los blastocistos. En el estudio de Varayoud *et al.* (2011) se observó también, junto con una disminución en el número de sitios de implantación, una menor expresión de integrina $\beta 3$ en el útero de los animales tratados (Varayoud *et al.*, 2011). Estos resultados son inconsistentes con los hallados en el presente proyecto, ya que los niveles de talina y paxilina aumentaron en el grupo con la madre tratada con respecto al control, sin embargo es posible que estas proteínas presenten una respuesta distinta a la de integrina $\beta 3$ o que las diferencias en los resultados hayan sido consecuencia de los diseños de los experimentos, ya que en el estudio de Pan *et al.* (2015), además de que fue realizado con ratones hembra y las dosis utilizadas fueron mucho mayores a la utilizada en el presente proyecto, los sitios de implantación evaluados fueron obtenidos de la generación F0 y no de la F1 como en el presente proyecto. En el estudio de Varayoud *et al.* (2011), por otro lado, además de que la administración fue subcutánea en lugar de oral y una de las dosis fue mayor que la utilizada en el presente proyecto, el tratamiento fue únicamente postnatal y no *in utero*. Estas diferencias de especie, vía de administración, ventana de exposición, dosis y generación evaluada podrían resultar en observaciones distintas e incluso opuestas, sin embargo son necesarios más estudios para comparar el efecto del BPA sobre integrina $\beta 3$. A pesar de estas discrepancias, cabe aclarar que las alteraciones en los niveles y la distribución de talina y paxilina, sobre todo la aparente desaparición tardía o incompleta de las adhesiones focales, sugieren una respuesta inadecuada del útero a P₄.

Por otro lado, en los ensayos de inmunofluorescencia de E-cadherina se observó una señal apical intensa y discontinua en la membrana plasmática de las CELU de los cuatro grupos experimentales, además de una señal basal muy leve. Comparando el grupo de hembra control-macho control con la literatura se encontró concordancia, ya que se ha observado que durante la gestación temprana en la rata, la expresión de E-cadherina es apical en el día 6 en la

membrana plasmática de las CELU (Slater *et al.*, 2002; Reuss *et al.*, 1996; Jha *et al.*, 2006). Sin embargo, en los tres grupos con animales tratados se observó una señal lateral adicional, siendo esta más notable en ambos grupos con el macho tratado. Esta señal podría indicar, al igual que en el caso de las adhesiones focales, una desaparición tardía o incompleta de la proteína, en este caso de las uniones adherentes de la membrana plasmática lateral. Así como fue discutido para talina y paxilina, la presencia de E-cadherina en la región lateral de la membrana plasmática de las CELU no es deseable en el momento de la implantación, ya que genera una adhesión célula-célula más fuerte que podría dificultar el desprendimiento de las células epiteliales y la penetración del blastocisto hacia el estroma (Paria *et al.*, 1999c; Thie *et al.*, 1996; Thie *et al.*, 1995; Thie *et al.*, 1998). Existe evidencia de que la desaparición de E-cadherina de las uniones adherentes es un prerrequisito para la adhesión del blastocisto (Li *et al.*, 2002; Thie *et al.*, 1996) y que por tanto, su persistencia en las uniones adherentes resulta en fallas en la implantación (Daikoku *et al.*, 2011; Nallasamy *et al.*, 2012). Por otro lado, la ausencia completa de E-cadherina en el útero lleva a la infertilidad femenina debido a procesos de implantación y decidualización defectuosos (Reardon *et al.*, 2012), por lo que resulta evidente que la localización y los niveles adecuados de E-cadherina en el epitelio luminal uterino son esenciales para la correcta implantación y decidualización.

Al cuantificar la señal apical de E-cadherina en los ensayos de inmunofluorescencia, se observó un decremento en esta señal en los tres grupos con animales tratados con respecto al control. Este decremento fue estadísticamente significativo en el grupo con ambos padres tratados. La disminución en la cantidad de E-cadherina apical podría disminuir la adhesividad del epitelio luminal uterino y por ende su receptividad al blastocisto, dificultando así la adhesión inicial entre ellos y por tanto la posterior implantación. Este resultado tiene congruencia con lo observado en la cuantificación de los sitios de implantación, ya que únicamente el grupo con ambos padres tratados mostró una reducción significativa tanto de sitios de implantación como de señal de E-cadherina apical en el epitelio luminal uterino. Además, se llevó a cabo la

cuantificación densitométrica de la señal lateral de E-cadherina en el epitelio, encontrando una mayor intensidad en ambos grupos con el macho tratado. En este caso, el comportamiento de las señales apical y lateral no fue consistente dentro de los grupos como en el caso de talina y paxilina, por lo que se deduce un mayor efecto sobre la distribución de E-cadherina. A pesar de que los valores densitométricos de las señales apical y lateral no fueron directamente comparables entre sí, pudo compararse su relación en cada grupo con la del control. De esta manera se observó que en los tres grupos con animales tratados, el cociente de la densidad óptica de la señal apical de E-cadherina entre la lateral fue menor con respecto al control. Este cociente fue menor en el grupo ♀C-♂B que en el grupo ♀B-♂C y aún menor en el grupo ♀B-♂B, sugiriendo un mayor efecto del macho tratado sobre la localización de E-cadherina y un efecto aditivo de ambos padres.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de Western blot de las CELU, el cual reveló una menor cantidad de E-cadherina en el epitelio luminal uterino de los tres grupos con animales tratados. En este caso la disminución fue más notable en ambos grupos con el macho tratado y estadísticamente significativa en el grupo ♀C-♂B. Cabe destacar que la media del grupo ♀B-♂B fue muy similar a la del grupo ♀C-♂B y por ende mucho menor a la del grupo control, sin embargo, este grupo también presentó una varianza muy alta, por lo que es posible que por esta razón las pruebas estadísticas no hayan sido capaces de arrojar una diferencia significativa. Además, dado que en el análisis de Western blot se cuantificó la proteína del epitelio completo, es posible que la E-cadherina lateral, ligeramente mayor en ambos grupos con el macho tratado, haya compensado el efecto de la disminución de la E-cadherina apical en el grupo ♀B-♂B.

En conjunto, los resultados de E-cadherina sugieren que el tratamiento perinatal de ambos padres resultó en una disminución de la proteína en el epitelio luminal uterino. Esta disminución fue más significativa en ambos grupos con el macho tratado, sugiriendo un mayor efecto de este sobre los niveles de E-cadherina. Además, en estos mismos grupos (♀C-♂B y ♀B-♂B), la densidad óptica de la

señal lateral de la proteína fue mayor que en los otros dos grupos, que presentaron medias similares. Esto sugiere que además del efecto del macho tratado sobre los niveles de E-cadherina, este también tiene un efecto importante sobre la localización de la proteína en el momento de la implantación.

En cuanto a la concordancia con la literatura, existen pocos estudios que relacionan el efecto del BPA con E-cadherina en el útero durante la gestación. En el artículo ya mencionado de Borman *et al.* (2015), en el que se les administró BPA a ratones hembra en la gestación temprana, se reportó una disminución en la proporción de células epiteliales que expresaron E-cadherina al DG6. Esta observación estuvo acompañada de una disminución en el número de sitios de implantación al combinar la exposición al BPA con estrés por depredador. Otro estudio de este grupo de investigación, en el que se expusieron a ratones hembra preñadas del DG1 al 4 a BPA y DEHP (dietilhexil ftalato) de manera individual y conjunta, reportó un menor número de sitios de implantación adecuadamente desarrollados al DG6, así como una reducción de E-cadherina en el epitelio uterino de los animales expuestos a ambos compuestos (Borman *et al.* 2017). Los autores sugieren que los efectos observados podrían deberse al aumento de la relación estrógenos:progesterona. Otro estudio que apoya esta teoría es el de Rajabi *et al.* (2014) que correlaciona una disminución en el número de sitios de implantación con un aumento en el área luminal uterina, un decremento en los niveles de E-cadherina uterina y un decremento en los niveles de P₄ sérica. De igual manera, en el estudio ya mencionado de Jha *et al.* (2006) se reportó haber observado E-cadherina en ratones hembra ovariectomizadas en respuesta a P₄ exógena.

Con respecto a la ocludina, los ensayos de inmunofluorescencia mostraron una señal proteica apical en la membrana plasmática lateral de las CELU de los cuatro grupos experimentales. Esta señal fue puntual ya que, en el momento de la implantación, la ocludina está presente en las uniones estrechas, localizadas en la región apical intercelular del epitelio. Estos resultados concuerdan con la literatura (Nicholson *et al.*, 2010; Orchard *et al.*, 2002).

En cuanto a la localización o distribución de la proteína entre los cuatro grupos experimentales, no se observó una diferencia clara. Al llevar a cabo el análisis densitométrico de la señal de ocludina en la región apical de la membrana lateral de las CELU, se encontró una disminución en los tres grupos con animales tratados. Esta disminución fue más notable y estadísticamente significativa en ambos grupos con el macho tratado. Una reducción en la cantidad de ocludina en las uniones estrechas del epitelio luminal uterino en el momento de la implantación podría resultar en uniones más permeables y una desregulación del transporte paracelular. Esto a su vez podría resultar en una alteración de la composición del fluido luminal que podría interferir con la adhesión del blastocisto y su posterior desarrollo en el estroma. Estos resultados concuerdan con los previamente reportados por nuestro grupo de investigación, en donde un tratamiento perinatal con BPA resultó en diversas alteraciones en los niveles y patrones de distribución de distintas proteínas de uniones estrechas (ZO-1 y claudinas 1, 3, 4 y 7) en las CELU de ratas durante la gestación temprana (Martínez-Peña *et al.*, 2017).

Como análisis complementario, se llevó a cabo un Western blot de las CELU para ocludina. En este caso, únicamente se observó una disminución en la cantidad de ocludina en ambos grupos con el macho tratado. Esta disminución fue estadísticamente significativa en el grupo ♀C-♂B pero no en el grupo ♀B-♂B, mientras que el grupo ♀B-♂C presentó una media similar a la del grupo control.

Comparando los resultados con la literatura, en un estudio que constó de dos experimentos, tanto un tratamiento de ratas con 50 mg/kg de pc/día de BPA durante 6 días (día postnatal 20-25) como una exposición *in vitro* de células de Sertoli a 200 µM de BPA, provocaron una alteración en la localización de ocludina con respecto a los controles, ya que los animales y las células tratados con el compuesto mostraron una localización citoplasmática de ocludina mientras que los controles la presentaron en la interfase célula-célula (Li *et al.*, 2009). De igual manera, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación con el mismo tratamiento farmacológico que el presente proyecto demostró una señal leve de ocludina en el citoplasma de las CELU de los sitios de implantación (DG6) además

de un claro decremento en la señal proteica en los sitios de implantación al DG7 con respecto al control (Martínez-Peña, 2014). Por otro lado, un estudio en el que se expuso a células de Sertoli humanas (HSeC) a una concentración de 20 μ M de BPA durante 6 y 48 horas, demostró un decremento en la cantidad de ocludina y adhesiones celulares fenotípicamente alteradas (de Freitas *et al.*, 2016). Además, en el estudio ya mencionado de Nicholson *et al.* (2010), los autores sugieren que es probable que exista un pool citoplasmático de ocludina que migra en el momento de la implantación hacia las uniones estrechas. Esta hipótesis junto con los estudios previamente mencionados, sugiere que el BPA tiene la capacidad de alterar esta migración de ocludina del citoplasma a la región apical de la membrana plasmática lateral. Esto podría explicar las diferencias observadas en el presente proyecto entre el análisis densitométrico de los ensayos de inmunofluorescencia y el Western blot, ya que en el primero únicamente se cuantificó la señal apical, mientras que en el segundo se cuantificó la proteína de todo el epitelio, incluyendo la citoplasmática. La razón por la que no se observó una señal fluorescente clara y persistente en el citosol de los úteros de los animales tratados podría estar relacionada con la conformación de la ocludina, ya que se ha reportado que esta tiene una influencia sobre la localización celular de las proteínas y es probable que sea distinta en el citosol y la membrana plasmática (Calderwood *et al.*, 2013; Banno *et al.*, 2012; Klapholz *et al.*, 2015). Es posible que en la conformación citosólica el anticuerpo utilizado no fuera capaz de reconocer su epítipo, sin embargo al desnaturalizar la proteína del epitelio en los Western blots, se pudieron haber expuesto los epítipos reconocibles.

Cabe destacar que en el estudio de Nicholson *et al.* (2010) se mencionó haber observado un aumento de la señal de ocludina en las uniones estrechas del epitelio luminal tanto en ratas gestantes en el momento de la implantación, como en ratas ovariectomizadas tratadas con P_4 , por lo que se sugiere que la expresión de esta proteína está regulada por la cantidad de P_4 , ya que no se observaron los mismos efectos en ratas ovariectomizadas tratadas únicamente con estrógenos.

En contraste, en un estudio que constó de tres experimentos, ratas ovariectomizadas fueron tratadas durante 15 días con 50 µg o 5 mg orales/kg de pc al día de BPA. Las ratas tratadas con la dosis alta también recibieron una inyección de ICI 182.780 (2 mg/kg de pc/día), un antagonista de receptor a estrógenos (ER) los últimos 5 días de tratamiento. Observaron que el tratamiento con BPA aumentó la cantidad de ocludina en el colon y que este efecto fue bloqueado con el antagonista de ER. En el segundo experimento, se les administró la dosis alta de BPA (5 mg/kg de pc al día) a hembras preñadas del DG15 al destete, se dejó que maduraran las crías y se analizó el epitelio del colon de todos los machos y las hembras en estro. En este caso, observaron un decremento en la permeabilidad intestinal en hembras y un decremento del mRNA del receptor a estrógenos β (ERβ) en los machos. Por último, observaron un aumento de ocludina en la línea celular humana Caco-2 (de adenocarcinoma de colon) expuesta a 10 nM de BPA. Los autores sugieren que tanto el BPA como el E₂ aumentan la cantidad de ocludina en el colon por medio de su unión a ERβ (Braniste *et al.*, 2010). En otro estudio, tras administrar una dosis de 2 o 20 mg/kg de pc de BPA a ratones hembra preñadas del DG6.5 al 16.5, se observó al DG17.5 un aumento en el mRNA de ocludina en el duodeno e íleon acompañado de una reducción de calcio sérico con la dosis de 20 mg (Otsuka *et al.*, 2012). Estos estudios ponen de manifiesto los efectos distintos e incluso opuestos del BPA sobre diferentes tejidos.

Como se mencionó en la discusión de los resultados de la cuantificación de los sitios de implantación, la detección de alteraciones en los animales adultos cuya exposición al compuesto fue únicamente a través de sus madres durante la gestación y lactancia sugiere un efecto a nivel epigenético. De manera general, el término epigenética hace referencia a los factores que regulan la expresión génica además de la secuencia del DNA. Esta información es heredable y flexible, y es directamente afectada por el ambiente. Los principales tipos de modificaciones epigenéticas son la metilación del DNA, la modificación de histonas y la transcripción de RNA no codificante (Esteller, 2007; Tammen *et al.*, 2013). De estos, la metilación es el tipo más estudiado y consiste en la adición de un grupo

metilo (CH₃) al carbono 5 de las citosinas. Por lo general se lleva a cabo en las islas CpG (ricas en citosina y guanina) de los promotores de los genes y suele asociarse la hipermetilación con el silenciamiento génico (Klose & Bird, 2006). Este proceso es dependiente de S-adenosilmetionina (SAM) como donador de metilos y de DNA metiltransferasas (DNMTs), que son las enzimas encargadas de llevar a cabo la reacción (Bernstein *et al.*, 2007; Tammen *et al.*, 2013). Por otro lado, las histonas son las proteínas a las cuales se encuentra unido el DNA de manera que puede compactarse dentro de la célula. La modificación de estas, principalmente metilación, acetilación y fosforilación, se lleva a cabo en la cola y puede resultar tanto en la activación como la inhibición de la transcripción (Berger, 2007). En general, la acetilación de histonas está asociada con una compactación más laxa de la cromatina y por tanto con la facilidad de transcripción (Turner, 2002; Kouzarides, 2007; Zama & Uzumcu, 2010). Los RNAs no codificantes son moléculas de RNA sin un marco abierto de lectura claro. Su tamaño varía desde 15 hasta más de 10000 nucleótidos y su papel principal es el silenciamiento génico, sin embargo participan en mecanismos diversos como la inactivación del cromosoma X, la regulación de la estructura de la cromatina, la impronta genómica y la metilación de DNA dirigida por RNA (Brosnan & Voinnet, 2009; Costa, 2005; Costa, 2008).

Diversos estudios han demostrado la capacidad del BPA de afectar el epigenoma tanto a nivel de hipo e hipermetilación del DNA (Dolinoy *et al.* 2007; Yaoi *et al.*, 2008; Bromer *et al.*, 2010; Doshi *et al.*, 2011; Senyildiz *et al.*, 2017), como de metilación (Doherty *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016) y acetilación de histonas (Hong *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017), niveles de mRNA de DNMTs (Kundakovic *et al.*, 2013; Doshi *et al.*, 2012), expresión de metiltransferasas de histonas (Doherty *et al.*, 2010) y niveles de RNAs no codificantes (Avissar-Whiting *et al.*, 2010; Verbanck *et al.*, 2017), y se ha sugerido además que es probable que esta capacidad sea independiente de su actividad estrogénica (Anway *et al.*, 2005; Bromer *et al.*, 2010). La mayor parte de estas observaciones resultaron de una exposición *in utero* tanto de hembras como de machos, ya que durante la embriogénesis el epigenoma es particularmente susceptible a la acción de

factores ambientales debido al alto índice de síntesis de DNA y al establecimiento de los patrones precisos de metilación y la estructura de la cromatina (Hong *et al.*, 2016). Además, durante la gametogénesis ocurre una ola de reprogramación epigenética cuya disrupción podría alterar el epigenoma de la siguiente generación (Feng *et al.*, 2010; Reik, 2007). De esta manera, al existir una exposición *in utero*, tanto la generación F0, como la F1 y las células germinales primordiales de la generación F2 están expuestas al compuesto (Jirtle & Skinner, 2007). Por tanto, los cambios epigenéticos pueden ser heredados tanto a las células somáticas como a las germinales, resultando en un epigenoma y transcriptoma alterados y heredables que pueden contribuir a la propensión a enfermedades en la etapa adulta (Li *et al.*, 2014; Newbold *et al.*, 2000; Blewitt *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 1999).

En el presente proyecto, se estudiaron algunas proteínas relacionadas con la receptividad uterina a la adhesión del blastocisto en hembras tratadas perinatalmente con BPA. Las alteraciones observadas en estos animales podrían deberse a cambios en la regulación epigenética que ocurrieron durante la exposición. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis y determinar con exactitud qué genes se vieron afectados por estos cambios, ya que la evidencia molecular y genética indica que tanto hormonas ováricas como citoquinas, factores de crecimiento, factores de transcripción homeobox, mediadores lipídicos y genes morfógenos participan, mediante interacciones autocrinas, paracrinas y yuxtacrinas, en el complejo proceso de la implantación (Dey *et al.*, 2004). Debido a que la mayor parte de las alteraciones observadas están relacionadas con un efecto disminuido de la P₄ sobre el útero (o una respuesta inadecuada de este a ella), los genes involucrados en el establecimiento de los niveles de esta hormona y los de sus receptores son de particular interés. Adicionalmente, existen diversos estudios que relacionan la exposición a BPA con alteraciones en los niveles de P₄ sérica (Spencer *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2010; Durando *et al.*, 2011; Martínez-Peña *et al.*, 2017) y sus receptores (PRA & PRB) en el útero (Berger *et al.*, 2010; Varayoud *et al.*, 2011; Aldad *et al.*, 2011; Vigezzi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

Además de los efectos directos del sistema endócrino de la hembra sobre la receptividad uterina, existe también la influencia de los blastocistos. La señalización bidireccional entre el útero y el blastocisto es esencial para la implantación, decidualización y placentación, por lo que una perturbación en estas señales puede tener como consecuencia la pérdida del embarazo (Chen *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2007; Wilcox *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2005). Se requiere entonces una sincronización entre la receptividad endometrial y la capacitación del blastocisto (Dey *et al.*, 2004; Tranguch *et al.*, 2005b; Wang & Dey, 2006). A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual el blastocisto influye en la receptividad endometrial, existe evidencia de que la presencia del embrión en el tracto reproductivo prepara al endometrio y puede ampliar la ventana de implantación al igual que la administración de P₄ exógena (Ueda *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007). Se sabe además que las señales del embrión son necesarias para la correcta implantación y decidualización (Zhang *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha reportado un aumento de los niveles de integrina $\beta 3$ en células epiteliales endometriales co-cultivadas con blastocistos (Srinivasan *et al.*, 2009). De igual manera, un estudio con células de Ishikawa reveló un aumento en la expresión de HOXA10 en células cultivadas en un medio libre de células donde se habían cultivado previamente blastocistos humanos, por lo que los autores proponen que no es necesario un contacto directo entre el embrión y el epitelio, sino que algunas de estas señales pueden ser moléculas solubles producidas por el embrión (Sakkas, 2011). Además, es probable que esta señalización induzca el desprendimiento de las células epiteliales luminales de la lámina basal, pues se ha sugerido que las células del trofoblasto pueden tener un efecto citotóxico sobre las células epiteliales luminales uterinas (Parr *et al.*, 1987) y se ha reportado que el blastocisto humano induce apoptosis parácrina cuando está en contacto directo con las células epiteliales endometriales *in vitro* (Galán *et al.*, 2000). También existen observaciones que sugieren que las CELU cambian su polaridad después del contacto inicial con el trofoblasto y que esta redistribución de moléculas de adhesión es afectada por el catión divalente de calcio (Gumbiner, 1992).

Tomando esto en cuenta, si el epigenoma del blastocisto (F2) se encuentra alterado, es posible que no se lleve a cabo una correcta comunicación entre este y el útero materno, ya que podría presentar impedimentos en la expresión de señales que afectan la receptividad endometrial. Estas alteraciones epigenéticas podrían provenir tanto del óvulo (F1) como del espermatozoide (F1) e incluso de ambos, ya que todas las células germinales primordiales estuvieron expuestas al BPA durante la gestación y lactancia, independientemente del género del progenitor. En cuanto al efecto sobre el ovocito, un estudio en el que se expusieron intraperitonealmente a ratones hembra a 20 o 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc cada quinto día del día postnatal 5 al 20 demostró una inhibición en la metilación de *Igf2r* y *Peg3*, además de disminuir la transcripción de *Dnmt1*, 3a, 3b y 3l en los ovocitos. Con la dosis alta, observaron también un aumento del ER α y su mRNA. Debido a que un tratamiento adicional con un inhibidor de ER (ICI182780) bloqueó el efecto sobre la transcripción de DNMTs, los autores sugieren que los efectos epigenéticos ocasionados por el BPA dependen de la señalización con ER (Chao *et al.*, 2012). En otro estudio, se les administró de forma oral BPA (0.5, 20 o 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc al día) a ratones hembra preñadas (F0) del DG11 hasta el nacimiento de las crías. Las hembras (F1) fueron apareadas con machos sanos para generar a las hembras F2 que a su vez generaron a las F3. Se analizó la expresión de diversos genes en los ovarios de las tres generaciones a los días postnatales 4 y 21. Los autores observaron que la exposición *in utero* de la generación F1 a las tres dosis de BPA alteró la expresión génica al día 21 en las generaciones F2 y F3, por lo que concluyeron que estas alteraciones podrían ser transgeneracionales (Berger *et al.*, 2016).

Con respecto al efecto sobre las células germinales primordiales masculinas, un estudio en el que el BPA se administró durante la gestación y lactancia a las madres F0, demostró una hipermetilación en los espermatozoides de los machos F1 congruente con la hipermetilación en la generación F2, por lo que los autores propusieron que las alteraciones epigenéticas generadas por el BPA son heredables a través de los machos (Mao *et al.*, 2015). Otro estudio en el que se trató neonatalmente a ratas macho (F1) con el compuesto demostró una reducción

en el perfil de expresión de receptores a esteroides en los testículos tanto de F1 como de F2 y F3, acompañada de un decremento en el conteo y la motilidad de espermatozoides, así como un aumento en la pérdida postimplantación y camadas más pequeñas al ser apareados con hembras sanas (Salian *et al.*, 2009a). Con el fin de dilucidar las causas de estos efectos, el mismo grupo de investigación llevó a cabo otro estudio muy similar en el que ratas hembra F0 fueron tratadas oralmente con BPA (1.2 y 2.4 µg/kg de pc al día) del DG12 al día postnatal 21 y se obtuvieron las generaciones F2 y F3 con las crías macho F1. En este estudio se observó una reducción significativa en la expresión de SRC-1, que es un coactivador del receptor a esteroides, en los testículos de las generaciones F1, F2 y F3, por lo que los autores llegaron a la conclusión de que la exposición perinatal de las ratas macho al BPA resultó en perturbaciones transgeneracionales en el perfil de expresión de receptores a esteroides y sus correguladores en el testículo, teniendo efectos en su fertilidad llegada la etapa adulta (Salian *et al.*, 2009b). De acuerdo con Doshi *et al.* (2013), la exposición neonatal de ratas macho (F0) a BPA (2.4 µg/cría) demostró cambios epigenéticos en sus embriones F1 reabsorbidos. Observaron una expresión disminuida de Igf2, un gen indispensable para el desarrollo fetal, y H19, un gen involucrado en la proliferación celular en los embriones reabsorbidos comparados con los embriones viables. Los espermatozoides de F0 mostraron el mismo patrón de metilación aberrante que sus embriones F1 reabsorbidos en la región de control de la impronta, por lo que concluyeron que el BPA generó cambios epigenéticos en los machos F0 que fueron heredados por los embriones F1 causando la pérdida postimplantación.

Con base en esta información, se consideró relevante estudiar a los blastocistos generados por los cuatro grupos experimentales. Para esto se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para E-cadherina. La señal proteica se presentó a lo largo de toda la membrana plasmática en el espacio intercelular de los blastocistos de los cuatro grupos, siendo ligeramente menos específica en el grupo ♀B-♂B. Comparando el grupo de hembra control-macho control con los antecedentes, los resultados fueron congruentes con lo reportado (Sefton *et al.*, 1992; Frenette & Wagner, 1996; Floridon *et al.*, 2000; Fleming *et al.*, 2001; Watson

& Barcroft, 2001). El 40% de los blastocistos del grupo ♀B-♂B presentó una morfología atípica. Al llevar a cabo la cuantificación densitométrica de la señal de E-cadherina, se observó una disminución en los blastocistos de ambos grupos con el macho tratado, siendo estadísticamente significativa en los blastocistos del grupo con ambos padres tratados. Esta disminución es congruente con la morfología atípica observada en algunos de los blastocistos de este grupo, ya que al haber una menor cantidad de E-cadherina, es muy probable que las células embrionales tengan una menor capacidad de adhesión y cohesión entre sí. La literatura reporta que la ausencia y la neutralización de E-cadherina en embriones de ratón resultan en la pérdida de compactación y viabilidad de los mismos, un desarrollo defectuoso y una falta de capacidad de implantación (Vestweber & Kemler, 1984; Larue *et al.*, 1994; Riethmacher *et al.*, 1995; De Vries *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004).

Existen pocos estudios que reportan el efecto del BPA sobre E-cadherina en embriones, sin embargo en un estudio realizado con células troncales de embriones humanos (hESCs), se observó una disminución en los niveles de E-cadherina al tratarlas con concentraciones bajas (10^{-9} - 10^{-6} M) de BPA durante su diferenciación a células epiteliales mamarias (Yang *et al.*, 2013). En otro estudio, se expusieron a células de la línea celular BeWo (células trofoblásticas humanas) a diferentes concentraciones de BPA (100 μ M, 1 μ M, 0.01 μ M) durante 24 horas y se co-cultivaron con células endometriales humanas. Se observó una disminución en la capacidad de invasión tras la exposición, además de un efecto bifásico del BPA sobre el mRNA de E-cadherina, ya que mientras la concentración más baja lo aumentó, las otras dos concentraciones lo redujeron con respecto al control (Wang *et al.*, 2015). Adicionalmente, Movaghar y Askarian (2012) reportaron haber observado una disminución de E-cadherina en blastocistos de ratón al haber superovulado a las madres. Esta disminución estuvo acompañada de una disminución de PR, por lo que la regulación de esta proteína en el blastocisto podría depender de la P₄. Un estudio que apoya esta teoría es el de Jo *et al.* (2015) ya que en el reportaron haber observado un aumento del mRNA de E-cadherina en células BeWo tratadas con P₄.

En resumen, en el presente proyecto se demostró que el tratamiento perinatal de ratas con la IDA (0.05 mg/kg de pc/día) de BPA tuvo un efecto negativo sobre el desarrollo y la homeostasis de su sistema endócrino y reproductivo, así como su fertilidad al llegar a la madurez sexual. Este efecto se vio reflejado en un aumento de la distancia anogenital al día del destete, un mayor porcentaje de hembras con ciclo estral irregular, una disminución en el número de sitios de implantación y una alteración en los niveles y patrones de distribución de proteínas de adhesión y uniones estrechas en el útero en el momento de la implantación, así como una disminución de una proteína de adhesión en los embriones generados por los animales tratados. De acuerdo con los resultados, es posible concluir que el efecto del tratamiento perinatal de las hembras con BPA se vio mayormente reflejado en la receptividad alterada del epitelio luminal uterino, ya que el útero estuvo directamente expuesto a este compuesto durante la organogénesis. Particularmente, la exposición de la hembra tuvo un impacto sobre la relocalización de talina en el momento de la implantación, sugiriendo un menor efecto de la P_4 sobre el útero o una menor respuesta de este a ella. Por otro lado, los resultados indican que la exposición perinatal de los machos tuvo un efecto directo sobre los embriones generados por ellos, probablemente debido a la exposición de las células germinales primordiales. Este efecto se vio reflejado en la alteración de la proteína de adhesión E-cadherina y de la proteína de unión estrecha ocludina en el útero de ambos grupos con el macho tratado, así como la morfología alterada de los embriones y la disminución de E-cadherina en ellos.

En conjunto, los efectos del disruptor endócrino sobre ambos padres parecen tener un efecto aditivo en la alteración de la función reproductiva. Estos resultados son relevantes debido a que son representativos de la situación actual, ya que tanto hombres como mujeres están expuestos al BPA y por ende es necesario tomar en cuenta el efecto de este compuesto sobre la fertilidad de ambos.

10. Conclusiones

- No se observaron diferencias significativas entre las camadas de las madres control y las tratadas con bisfenol-A con respecto al día de gestación en el que nacieron las crías, el número de crías nacidas vivas ni el número de crías al día del destete.
- Se observó un aumento en la distancia anogenital al día del destete de machos y hembras tratados perinatalmente con bisfenol-A, así como un mayor porcentaje de hembras con ciclo estral irregular, lo que sugiere una alteración en el desarrollo y la homeostasis de los sistemas endócrino y reproductivo.
- Se observó una disminución en el número de sitios de implantación en los tres grupos tratados con respecto al control, siendo esta disminución mayor en los grupos con el macho tratado y estadísticamente significativa en el grupo con ambos padres tratados, sugiriendo una mayor sensibilidad de los machos al compuesto, así como un mayor efecto sobre la fertilidad cuando ambos padres han sido tratados.
- Se observaron alteraciones en los niveles y patrones de distribución de dos proteínas de adhesiones focales (talina y paxilina) en las células del epitelio luminal uterino de las ratas de los tres grupos tratados. Se notó un mayor efecto de la exposición de la hembra sobre la relocalización talina y un efecto opuesto de la exposición de ambos padres sobre sus niveles en el momento de la implantación (aumentaron con la hembra tratada y disminuyeron con el macho tratado).
- Se observó una disminución en los niveles de una proteína de uniones adherentes (E-cadherina) en las células del epitelio luminal uterino de las ratas de los tres grupos tratados así como una alteración en su relocalización en el momento de la implantación en ambos grupos con el macho tratado.
- Se observó una disminución en los niveles de una proteína de uniones estrechas (occludina) en la región apical de la membrana lateral de las

células del epitelio luminal uterino de las ratas de los tres grupos tratados, siendo mayor este efecto en ambos grupos con el macho tratado.

- Se observó una disminución en los niveles de E-cadherina en los blastocistos del grupo con ambos padres tratados.
- La disrupción del desarrollo y la homeostasis de los sistemas endócrino y reproductivo de ratas tratadas perinatalmente con bisfenol-A llevó a la alteración en los niveles y la localización de dos proteínas de adhesiones focales, una de uniones adherentes y una de uniones estrechas en el epitelio luminal uterino en el momento de la implantación. Estas alteraciones, junto con la reducción de los niveles de una proteína de adhesión en los blastocistos, correlacionaron con un menor número de sitios de implantación al haber expuesto a ambos padres al compuesto.

11. Perspectivas

Es necesario profundizar en el estudio del mecanismo molecular a través del cual el BPA ejerce su efecto sobre las proteínas estudiadas y la fertilidad. Es por ello que es relevante continuar evaluando, en los animales tratados con BPA, diferentes proteínas relacionadas con el proceso de implantación (citoesqueleto, adhesión, apoptosis, proliferación, matriz extracelular, factores de transcripción y correguladores) y proteínas involucradas en la viabilidad y capacitación del blastocisto.

Así mismo, ya que se ha reportado que estas proteínas son reguladas por E_2 y P_4 , se propone cuantificar E_2 y P_4 séricos y analizar la expresión de ER y PR uterinos en hembras tratadas perinatalmente.

De igual manera, se propone indagar en los posibles mecanismos por los cuales el BPA podría tener un efecto sobre el epigenoma de los animales tratados perinatalmente y su descendencia.

12. Referencias

- Alavi, N., Lianos, E.A., Palant, C.E. & Bentzel, C.J. (1983). "Induction of epithelial tight junctions by a light chain protein isolated from a patient with Fanconi's syndrome". *Nephron*, 35(2), 130-135.
- Aldad, T.S., Rahmani, N., Leranath, C. & Taylor, H.S. (2011). "Bisphenol-A exposure alters endometrial progesterone receptor expression in the nonhuman primate". *Fertility and Sterility*, 96(1), 175-179. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.010.
- Ando-Akatsuka, Y., Saitou, M., Hirase, T., Kishi, M., Sakakibata, A., Itoh, H., Yonemura, S., Furuse, M. & Tsukita, S. (1996). "Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog and rat-kangaroo homologues". *The Journal of Cell Biology*. 133(1), 43-47.
- Anthis, N.J., Wegener, K.L., Ye, F., Kim, C., Goult, B.T., Lowe, E.D., Vakonakis, I., Bate, N., Critchley, D.R., Ginsberg, M.H. & Campbell, I.D. (2009). "The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction". *EMBO J.* 28(22), 3623-3632. doi: 10.1038/emboj.2009.287.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. & Skinner, M.K. (2005). "Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility". *Science*, 308, 1466–1469.
- Apparao, K., Murray, M., Fritz, M., Meyer, W., Chambers, A., Truong, P. & Lessey, B. (2001). "Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially". *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 86(10), 4991–5000.
- Atkinson, A. & Roy, D. (1995). "In vivo DNA adduct formation by bisphenol A". *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26(1), 60-66.
- Avisar-Whiting, M., Veiga, K.R., Uhl, K.M., Maccani, M.A., Gagne, L.A., Moen, E.L. & Marsit, C.J. (2010). "Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells". *Reprod Toxicol.*, 29(4), 401-406. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.04.004.
- Balda, M.S. & Matter, K. (2000). "The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression". *EMBO J.*, 19(9), 2024-2033.

- Banno, A., Goult, B.T., Lee, H., Bate, N., Critchley, D.R. & Ginsberg, M.H. (2012). "Subcellular localization of talin is regulated by inter-domain interactions". *J Biol Chem.*, 287(17), 13799-13812. doi: 10.1074/jbc.M112.341214.
- Becker, K., Goen, T., Seiwert, M., Conrad, A., Pick-Fuss, H., Muller, J., Wittassek, M., Schulz, C. & Kolossa-Gehring, M. (2009). "Ger ES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children". *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(6), 685-692.
- Bellis, S. L., Perrotta, J. A., Curtis, M. S. and Turner, C. E. (1997). "Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin". *Biochem. J.*, 325 (2), 375-381.
- Berger, A., Ziv-Gal, A., Cudiamat, A., Wang, W., Zhou, C. & Flaws, J.A. (2016). "The effects of in utero bisphenol A exposure on the ovaries in multiple generations of mice". *Reprod Toxicol.*, 60, 39–52.
- Berger, R.G., Foster, W.G. & deCatanzaro, D. (2010). "Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice". *Reproductive Toxicology*, 30, 393–400.
- Berger, R., Shaw, J. & deCatanzaro, D. (2008). "Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol". *Reproductive Toxicology*, 26(2), 94-99. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.06.007
- Berger, S.L. (2007). "The complex language of chromatin regulation during transcription". *Nature*, 447, 407–412.
- Bernstein, B.E., Meissner, A. & Lander, E.S. (2007). "The mammalian epigenome". *Cell*, 128, 669–681.
- Bhandari, R.K., Deem, S.L., Holliday, D.K., Jandegian, C.M., Kassotis, C.D., Nagel, S.C., Tillitt, D.E., Vom Saal, F.S. & Rosenfeld, C.S., (2014). "Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17a-ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species". *Gen. Comp. Endocrinol.*, 214, 195-219.

- Blewitt, M.E., Vickaryous, N.K., Paldi, A., Koseki, H. & Whitelaw, E. (2006). "Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice". *PLoS Genet.*, 2(4), e49.
- Bloor, D., Metcalfe, A., Rutherford, A., Brison, D. & Kimber, S. (2002). "Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development". *Molecular Human Reproduction*, 8(3), 237-245.
- Bois, P.R., O'Hara, B.P., Nietlispach, D., Kirkpatrick, J. & Izard, T. (2006). "The vinculin binding sites of talin and alpha-actinin are sufficient to activate vinculin". *J Biol Chem.*, 281(11), 7228-7236.
- Borman, E.D., Foster, W.G., deCatanzaro, D. (2017). "Concurrent administration of diethylhexyl phthalate reduces the threshold dose at which bisphenol A disrupts blastocyst implantation and cadherins in mice". *Environ Toxicol Pharmacol.*, 49, 105-111. doi: 10.1016/j.etap.2016.12.003.
- Borman, E., Foster, W., Greenacre, M., Muir, C. & deCatanzaro, D. (2015). "Stress lowers the threshold dose at which bisphenol A disrupts blastocyst implantation, in conjunction with decreased uterine closure and e-cadherin". *Chemico-Biological Interactions*, 237, 87-95.
- Bosquiazzo, V., Varayoud, J., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. & Ramos, J. (2010). "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". *Biology of Reproduction*, 82(1), 86-95. doi: 10.1095/biolreprod.109.078543.
- Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E., Polizzi, A., Buisson-Brenac, C., Leveque, M., Martin, P.G., Theodorou, V., Fioramonti, J. & Houdeau, E. (2010). "Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats". *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107(1), 448-453. doi: 10.1073/pnas.0907697107.
- Briño-Enríquez, M.A., Robles, P., Camats-Tarruella, N., García-Cruz, R., Roig, I., Cabero, L., Martínez, F., Caldés, M.G. (2011). "Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development". *Hum Reprod.*, 26(10), 2807-2818. doi: 10.1093/humrep/der249.

- Bromer, J.G., Zhou, Y., Taylor, M.B., Doherty, L. & Taylor, H.S. (2010). "Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response". *FASEB J.*, *24*, 2273–2280.
- Bronson, R. & Fusi, F. (1996). "Integrins and human reproduction". *Molecular Human Reproduction*, *2*(3),153-168.
- Brosnan, C.A. & Voinnet, O. (2009). "The long and the short of noncoding RNAs". *Curr Opin Cell Biol.*, *21*(3), 416-425. doi: 10.1016/j.ceb.2009.04.001.
- Brown, M. C. & Turner, C. E. (2004). "Paxillin: adapting to change". *Physiol. Rev.*, *84*, 1315-1339.
- Brown, N.H., Gregory, S.L., Rickoll, W.L., Fessler, L.I., Prout, M., White, R.A. & Fristrom, J.W. (2002). "Talin is essential for integrin function in Drosophila". *Dev Cell.*, *3*(4), 569-579.
- Brown, M. C., Perrotta, J. A. & Turner, C. E. (1998b). "Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin". *Mol. Biol. Cell*, *9*, 1803-1816.
- Brown, M. C., Perrotta, J. A. & Turner, C. E. (1996). "Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding". *J. Cell Biol.*, *135*, 1109-1123.
- Burrige, K., Turner, C. E. and Romer, L. H. (1992). "Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly". *J. Cell Biol.*, *119*, 893-903.
- Cabaton, N., Wadia, P., Rubin, B., Zalko, D., Schaeberle, C., Askenase, M., Gadbois, J., Tharp, A., Whitt, G., Sonnenschein, C. & Soto, A. (2011). "Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice". *Environmental Health Perspectives*, *119*(4), 547-52.
- Calafat, A.M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L.T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K. & Hauser, R. (2009). "Exposure to Bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants". *Environmental Health Perspectives*, *117*(4), 639–644.

- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A. & Needham, L.L. (2008). "Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004". *Environmental Health Perspectives*, 16(1), 39–44.
- Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J. & Needham, L.L. (2005). "Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population". *Environmental Health Perspectives*, 113(4), 391–395.
- Calderwood, D.A., Campbell, I.D. & Critchley, D.R. (2013). "Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion". *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 14(8), 503-517. doi: 10.1038/nrm3624.
- Calderwood, D.A. (2004a). "Integrin activation". *J Cell Sci.*, 117(5), 657-666.
- Calderwood, D.A. (2004b). "Talin controls integrin activation". *Biochem Soc Trans.*, 32(3), 434-437.
- Calderwood, D.A. & Ginsberg, M.H. (2003). "Talin forges the links between integrins and actin". *Nat Cell Biol.*, 5(8), 694-697.
- Calderwood, D.A., Zent, R., Grant, R., Rees, D.J., Hynes, R.O. & Ginsberg, M.H. (1999). "The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation". *J Biol Chem.*, 274(40), 28071-28074.
- Campbell, S., Swann, H.R., Seif, M.W., Kimber, S.J. & Aplin, J.D. (1995). "Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo". *Human Reproduction*, 10(6), 1571-1578.
- Cantonwine, D., Meeker, J.D., Hu, H., Sánchez, B.N., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado-García, A., Fortenberry, G.Z., Calafat, A.M. & Téllez-Rojo, M.M. (2010) "Bisphenol A exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study". *Environmental Health*, 18, 9-62.
- Cappiello, M., Giuliani, L., Rane, A. & Pacifici, G.M. (2000). "Uridine 5 - diphosphoglucuronic acid (UDPGLcUA) in the human fetal liver, kidney and placenta". *The European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 25, 161–163.
- Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A.M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J. & Ballestrem, C. (2013). "Vinculin regulates the

recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner". *Curr Biol.*, 23(4), 271-281. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.009.

-Carragher, N. O., Levkau, B., Ross, R. & Raines, E. W. (1999). "Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin". *J. Cell Biol.*, 147, 619- 630.

-Caserta, D., Bordi, G., Ciardo, F., Marci, R., La Rocca, C., Tait, S., Bergamasco, B., Stecca, L., Mantovani, A., Guerranti, C., Fanello, E.L., Perra, G., Borghini, F., Focardi, S.E. & Moscarini, M. (2013). "The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women". *Gynecological Endocrinology*, 29(5), 444-447.

-Ceydeli, N., Kaleli, S., Calay, Z., Erel, C.T., Akbas, F. & Ertungealp, E. (2006). "Difference in alpha(v)beta3 integrin expression in endometrial stromal cell in subgroups of women with unexplained infertility". *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 126(2), 206-211.

-Chao, H.H., Zhang, X.F., Chen, B., Pan, B., Zhang, L.J., Li, L., Sun, X.F., Shi, Q.H. & Shen, W. (2012). "Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the estrogen receptor signaling pathway". *Histochem Cell Biol.*, 137(2), 249-259. doi: 10.1007/s00418-011-0894-z.

-Chen, Z., Zuo, X., He, D., Ding, S., Xu, F., Yang, H., Jin, X., Fan, Y., Ying, L., Tian, C. & Ying, C. (2017). "Long-term exposure to a 'safe' dose of bisphenol A reduced protein acetylation in adult rat testes". *Sci Rep.*, 7, 40337. doi: 10.1038/srep40337.

-Chen, Q., Zhang, Y., Peng, H., Lei, L., Kuang, H., Zhang, L., Ning, L., Cao, Y. & Duan, E. (2011). "Transient β 2-adrenoceptor activation confers pregnancy loss by disrupting embryo spacing at implantation". *J Biol Chem.*, 286(6), 4349-4356. doi: 10.1074/jbc.M110.197202.

-Chen, H.C., Appeddu, P.A., Parsons, J.T., Hildebrand, J.D., Schaller, M.D. & Guan, J.L. (1995). "Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin". *J Biol Chem.*, 270(28), 16995-16999.

-Choi, C.K., Zareno, J., Digman, M.A., Gratton, E. & Horwitz, A.R. (2011). "Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions". *Biophys J.*, 100(3), 583-592. doi: 10.1016/j.bpj.2010.12.3719.

- Chouhan, S., Yadav, S.K., Prakash, J., Westfall, S., Ghosh, A., Agarwal, N.K. & Singh, S.P. (2015). "Increase in the expression of inducible nitric oxide synthase on exposure to bisphenol A: a possible cause for decline in steroidogenesis in male mice". *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 405-416. doi: 10.1016/j.etap.2014.09.014.
- Cohen, E., Talmon, A., Faff, O., Bacher, A & Ben-Shaul, Y. (1985). "Formation of tight junctions in epithelial cells. I. Induction by proteases in a human colon carcinoma cell line". *Exp Cell Res*, 156(1), 103-116.
- Cortasio, C.L., Boateng, L.R., Piazza, T.M., Bennin, D.A. & Huttenlocher, A. (2011). Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *J Biol Chem.*, 286(12), 9998-10006. doi: 10.1074/jbc.M110.187294.
- Costa, F.F. (2008). "Non-coding RNAs, epigenetics and complexity". *Gene*, 410(1), 9-17. doi: 10.1016/j.gene.2007.12.008.
- Costa, F.F. (2005). "Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology". *Gene*, 357(2), 83-94.
- Cote, J.F., Turner, C.E. & Tremblay, M. L. (1999). "Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST". *J. Biol. Chem.*, 274, 20550-20560.
- Coutifaris, C., Kao, L.C., Sehdev, H.M., Chin, U., Babalola, G.O., Blaschuk, O.W. & Strauss, J.F. (1991). "E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts". *Development*, 113(3), 767-777.
- Cram, E.J., Clark, S.G. & Schwarzbauer, J.E. (2003). "Talin loss-of-function uncovers roles in cell contractility and migration in *C. elegans*". *J Cell Sci.*, 116(19), 3871-3878.
- Critchley, D.R. (2009). "Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin". *Annu Rev Biophys.*, 38, 235-254. doi: 10.1146/annurev.biophys.050708.133744.
- Critchley, D.R. (2000). "Focal adhesions - the cytoskeletal connection". *Curr Opin Cell Biol.*, 12(1), 133-139.
- Daikoku, T., Cha, J., Sun, X., Tranguch, S., Xie, H., Fujita, T., Hirota, Y., Lydon, J., DeMayo, F., Maxson, R. & Dey, S.K. (2011). "Conditional deletion of Msx homeobox

genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity". *Dev Cell.*, 21(6), 1014-1025. doi: 10.1016/j.devcel.2011.09.010.

-Dawid, I.B., Breen, J.J. & Toyama, R. (1998). "LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions". *Trends Genet.*, 14, 156-162.

-Dawood, M.Y., Lau, M. & Khan-Dawood, F.S. (1998). "E-cadherin and its messenger ribonucleic acid in periimplantation phase human endometrium in normal and clomiphene-treated cycles". *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 178 (5), 996-1001.

-de Freitas, A.T., Ribeiro, M.A., Pinho, C.F., Peixoto, A.R., Domeniconi, R.F. & Scarano, W.R. (2016). "Regulatory and junctional proteins of the blood-testis barrier in human Sertoli cells are modified by monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA) exposure". *Toxicol In Vitro.*, 34, 1-7. doi: 10.1016/j.tiv.2016.02.017.

-De Vries, W.N., Evsikov, A.V., Haac, B.E., Fancher, K.S., Holbrook, A.E., Kemler, R., Solter, D. & Knowles, B.B. (2004). "Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development". *Development*, 131(18), 4435-4445.

-Dedhar, S. (2000). "Cell-substrate interactions and signaling through ILK". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, 250-256.

-Dey, S.K., Lim, H., Das, S.K., Reese, J., Paria, B.C., Daikoku, T., Wang, H. (2004). "Molecular cues to implantation". *Endocr Rev.*, 25(3), 341-373.

-Digman, M. A., Brown, C. M., Horwitz, A. F., Mantulin, W. W. & Gratton, E. (2007). "Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy". *Biophys. J.*, 94, 2819-2831.

-Doerge, D.R., Twaddle, N.C., Vanlandingham, M. & Fisher, J.W. (2010). "Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247(2), 158-165. doi: 10.1016/j.taap.2010.06.008.

-Doherty, L.F., Bromer, J.G., Zhou, Y., Aldad, T.S. & Taylor, H.S., (2010). "In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer". *Horm. Cancer*, 1, 146-155.

- Dolinoy, D.C., Huang, D. & Jirtle, R.L. (2007). "Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development". *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104, 13056–13061.
- Doshi, T., D'souza, C. & Vanage, G. (2013). "Aberrant DNA methylation at Igf2-H19 imprinting control region in spermatozoa upon neonatal exposure to bisphenol A and its association with post implantation loss". *Mol Biol Rep.*, 40(8), 4747-4757. doi: 10.1007/s11033-013-2571-x.
- Doshi, T., D'Souza, C., Dighe, V. & Vanage, G. (2012). "Effect of neonatal exposure on male rats to bisphenol A on the expression of DNA methylation machinery in the postimplantation embryo". *J Biochem Mol Toxicol.*, 26(9), 337-343. doi: 10.1002/jbt.21425.
- Doshi, T., Mehta, S.S., Dighe, V., Balasinor, N. & Vanage, G. (2011). "Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A". *Toxicology*, 18, 289(2-3), 74-82. doi: 10.1016/j.tox.2011.07.011.
- Dunlap, K.A., Filant, J., Hayashi, K., Rucker, E.B., Song, G., Deng, J.M., Behringer, R.R., DeMayo, F.J., Lydon, J., Jeong, J.W. & Spencer, T.E. (2011). "Postnatal Deletion of Wnt7a Inhibits Uterine Gland Morphogenesis and Compromises Adult Fertility in Mice". *Biology of Reproduction*, 85(2), 386–396.
- Durando, M., Kass, L., Perdomo, V., Bosquiazzo, V.L., Luque, E.H. & Muñoz-de-Toro, M. (2011). "Prenatal exposure to bisphenol A promotes angiogenesis and alters steroid-mediated responses in the mammary glands of cycling rats". *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 127(1-2), 35-43. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.04.001.
- Ehrlich, S., Williams, P.L., Missmer, S.A., Flaws, J.A., Berry, K.F., Calafat, A.M., Ye, X., Petrozza, J.C., Wright, D. & Hauser, R. (2012). "Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization". *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 978-983. doi: 10.1289/ehp.1104307.
- Elsby, R., Maggs, J.L., Ashby, J. & Park, B.K. (2001). "Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of Bisphenol A: implications for extrapolation to humans". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297, 103–113.

- Esteller, M. (2007). "Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps". *Nat. Rev. Genet.*, 8, 286–298.
- Farquhar, M.G., & Palade, G.E. (1963). "Junctional Complexes in various epithelia". *J Cell Biol.*, 17, 375-412.
- Félix-Cañedo, T.E., Durán-Álvarez, J.C. & Jiménez-Cisneros, B. (2013). "The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources." *Science of the Total Environment*, 454-455, 109-118. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.088.
- Feng, S., Jacobsen, S.E. & Reik, W. (2010). "Epigenetic reprogramming in plant and animal development". *Science*, 330, 622–627.
- Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V. & Libertun, C. (2010). "Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats". *Environ Health Perspect.*, 118(9), 1217-1222. doi: 10.1289/ehp.0901257.
- Fleming, T.P., Sheth, B. & Fesenko, I. (2001). "Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis". *Frontiers in Bioscience*, 6, D1000-D1007.
- Floridon, C., Nielsen, O., Holund, B., Sunde, L., Westergaard, J.G., Thomsen, S.G. & Teisner, B. (2000). "Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy". *Molecular Human Reproduction*, 6(10), 943-950.
- Franco, S.J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R. and Huttenlocher, A. (2004). "Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics". *Nat. Cell Biol.*, 6, 977-983.
- Frenette, P.S. & Wagner D.D. (1996). "Adhesion molecules--Part 1". *The New England Journal of Medicine*, 334(23), 1526-1529.
- Fukuda, M.N. & Sugihara, K. (2008). "An integrated view of L-selectin and trophinin function in human embryo implantation". *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 34, 129–136.

- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, S. (1993). "Occludin: a model integral membrane protein localizing at tight junctions". *The Journal of Cell Biology*, 123, 1777-1788.
- Galán, A., Herrero, R., Remohí, J., Pellicer, A. & Simón, C. (2000). "Embryonic regulation of endometrial epithelial apoptosis during human implantation". *Hum Reprod.*, 15 (6), 74-80.
- Gallavan, R.H., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F. & Reynolds, V.L. (1999). "Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights". *Reprod Toxicol.*, 13(5), 383-390.
- Geens, T., Apelbaum, T.Z., Goeyens, L., Neels, H. & Covaci, A. (2010). "Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market". *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27(11), 1627-1637. doi: 10.1080/19440049.2010.508183.
- Ghassemifar, M.R., Sheth, B., Papenbrock, T., Leese, H.J., Houghton, F.D. & Fleming, T.P. (2002). "Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain". *J Cell Sci.*, 115(5), 3171-3180.
- Gilula, N.B., Fawcett, D.W. & Aoki, A. (1976). "The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis". *Dev Biol.*, 50(1), 142-168.
- Gingras, A.R., Bate, N., Goult, B.T., Patel, B., Kopp, P.M., Emsley, J., Barsukov, I.L., Roberts, G.C. & Critchley, D.R. (2010). "Central region of talin has a unique fold that binds vinculin and actin". *J Biol Chem.*, 285(38), 29577-29587. doi: 10.1074/jbc.M109.095455.
- Gingras, A.R., Bate, N., Goult, B.T., Hazelwood, L., Canestrelli, I., Grossmann, J.G., Liu, H., Putz, N.S., Roberts, G.C., Volkmann, N., Hanein, D., Barsukov, I.L. & Critchley, D.R. (2008). "The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin". *EMBO J.*, 27(2), 458-469.
- Glenney, J.R. Jr & Zokas, L. (1989). "Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton". *J Cell Biol.*, 108(6), 2401-2408.

- Gonzalez, R.R., Palomino, A., Boric, A., Vega, M. & Devoto, L. (1999). "A quantitative evaluation of alpha1, alpha4, alphaV and beta3 endometrial integrins of fertile and unexplained infertile women during the menstrual cycle. A flow cytometric appraisal". *Human Reproduction*, 14(10), 2485-2492.
- Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P. & Gaido, K.W. (1998). "Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol". *Mol Cell Endocrinol.*, 142, 203–214.
- Goult, B.T., Xu, X.P., Gingras, A.R., Swift, M., Patel, B., Bate, N., Kopp, P.M., Barsukov, I.L., Critchley, D.R., Volkman, N. & Hanein, D. (2013). "Structural studies on full-length talin1 reveal a compact auto-inhibited dimer: implications for talin activation". *J Struct Biol.*, 184(1), 21-32. doi: 10.1016/j.jsb.2013.05.014.
- Gumbiner, B.M. (1993). "Breaking through the tight junction barrier". *J Cell Biol.*, 123, 1631-1633.
- Gumbiner, B.M. (1992). "Epithelial morphogenesis". *Cell*, 69(3), 385-387.
- Hassold, T. & Hunt, P. (2001). "To ERR (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy". *Nature Reviews Genetics*, 2, 280–291.
- Hayashi, M., Suzuki, H., Kawashima, S., Saido, T.C., Inomata, M. (1999). "The behavior of calpain-generated N- and C-terminal fragments of talin in integrin-mediated signaling pathways". *Arch Biochem Biophys.*, 371(2), 133-141.
- He, Y., Miao, M., Herrinton, L.J., Wu, C., Yuan, W., Zhou, Z. & Li, D.K. (2009). "Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels". *Environmental Research*, 109, 629-633.
- Hemmings, L., Rees, D.J., Ohanian, V., Bolton, S.J., Gilmore, A.P., Patel, B., Priddle, H., Trevithick, J.E., Hynes, R.O. & Critchley, D.R. (1996). "Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site". *J Cell Sci.*, 109 (11), 2715-2726.
- Herreros, L., Rodriguez-Fernandez, J. L., Brown, M. C., Alonso-Lebrero, J. L., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Longo, N., Turner, C. E. & Sanchez-Mateos, P. (2000). "Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton". *J. Biol. Chem.*, 275, 26436-26440.

- Hong, J., Chen, F., Wang, X., Bai, Y., Zhou, R., Li, Y. & Chen, L. (2016). "Exposure of preimplantation embryos to low-dose bisphenol A impairs testes development and suppresses histone acetylation of StAR promoter to reduce production of testosterone in mice". *Mol Cell Endocrinol.*, *427*, 101-111. doi: 10.1016/j.mce.2016.03.009.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H. & Iguchi, T. (2002) "Low dose effects of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction". *Reproductive Toxicology*, *16*, 117–122.
- Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A., Vandenberg, J.G. & vom Saal, F.S. (1999). "Exposure to bisphenol A advances puberty". *Nature*, *401*, 763–764.
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. & Taketani, Y. (2002) "Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure". *Human Reproduction*, *17*, 2839–2841.
- Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y. & Iwano, H. (2004). "Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats". *Drug Metabolism & Disposition*, *33*, 55–59.
- Inoue, K., Kawaguchi, M., Funakoshi, Y. & Nakazawa, H. (2003). "Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography–mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*, *798*, 17–23.
- Ishibashi, H., Watanabe, N., Matsumura, N., Hirano, M., Nagao, Y., Shiratsuchi, H., Kohra, S., Yoshihara, S. & Arizono, K. (2005). "Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*)". *Life Sciences*, *77*(21), 2643-2655.
- Jaeg, J.P., Perdu, E., Dolo, L., Debrauwer, L., Cravedi, J.P. & Zalko, D. (2004). "Characterization of new bisphenol a metabolites produced by CD1 mice liver microsomes and S9 fractions". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(15), 4935-4942.
- Jha, R.K., Titus, S., Saxena, D., Kumar, P.G. & Laloraya, M. (2006). "Profiling of E-cadherin, beta-catenin and Ca(2+) in embryo-uterine interactions at implantation". *FEBS Letters*, *580*(24), 5653-5660.

-Jirtle, R.L. & Skinner, M.K., (2007). "Environmental epigenomics and disease susceptibility". *Nat. Rev. Genet.*, 8, 253–262.

-Jo, Y.S., Lee, G.S., Nam, S.Y., Kim, S.J. (2015). "Progesterone Inhibits Leptin-Induced Invasiveness of BeWo Cells". *Int J Med Sci.*, 12(10), 773-779. doi: 10.7150/ijms.11610.

-Kaneko, Y., Lecce, L., Day, M.L. & Murphy, C.R. (2011). " $\beta(1)$ and $\beta(3)$ integrins disassemble from basal focal adhesions and $\beta(3)$ integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation". *Reproduction, Fertility and Development*, 23(3), 481-495. doi: 10.1071/RD10211.

-Kaneko, Y., Lecce, L. & Murphy, C.R. (2009). "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(6), 613-622. doi: 10.1007/s00418-009-0641-x.

-Kaneko, Y., Lindsay, L.A. & Murphy, C.R. (2008). "Focal adhesions disassemble during early pregnancy in rat uterine epithelial cells". *Reprod Fertil*, 20(8), 892-899.

-Karp, G., (2011). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. Ciudad de México, México. McGraw-Hill Interamericana editores S.A. de C.V.

-Kendig, E.L., Buesing, D.R., Christie, S.M., Cookman, C.J., Gear, R.B., Hugo, E.R., Kasper, S.N., Kendzioriski, J.A., Ungi, K.R., Williams, K. & Belcher, S.M. (2012). "Estrogen-like disruptive effects of dietary exposure to BPA or 17 α -ethinyl estradiol in CD1 mice". *International Journal of Toxicology*, 31(6), 537-550. doi: 10.1177/1091581812463254.

-Kim, C., Ye, F., Hu, X. & Ginsberg, M.H. (2012). "Talin activates integrins by altering the topology of the β transmembrane domain". *J Cell Biol.*, 197(5), 605-611. doi: 10.1083/jcb.201112141.

-Kim, C., Ye, F. & Ginsberg, M.H. (2011). "Regulation of integrin activation". *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 27, 321-345. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104104.

-Kim, J., Chan Gye, M. & Kyoo Kim, M. (2004). "Role of Occludin, a Tight Junction Protein, in Blastocoel Formation, and in the Paracellular Permeability and Differentiation of Trophectoderm in Preimplantation Mouse Embryos". *The Journal of Molecules and Cells*, 17(2), 248-254.

- Klapholz, B., Herbert, S.L., Wellmann, J., Johnson, R., Parsons, M. & Brown, N.H. (2015). "Alternative mechanisms for talin to mediate integrin function". *Curr Biol.*, 25(7), 847-857. doi: 10.1016/j.cub.2015.01.043.
- Klentzeris, L.D., Bulmer, J.N., Trejdosiewicz, L.K., Morrison, L. & Cooke, I.D. (1993). "Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women". *Human Reproduction*, 8, 1223–1230.
- Klose, R.J. & Bird, A.P. (2006). "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators". *Trends Biochem Sci.*, 31, 89–97.
- Kobayashi, K., Miyagawa, M., Wang, R.S., Sekiguchi, S., Suda, M. & Honma, T. (2002). "Effects of in utero and lactational exposure to BPA on somatic growth and anogenital distance in F1 rat offspring". *Industrial Health*, 40(4), 375-381.
- Kopp, P.M., Bate, N., Hansen, T.M., Brindle, N.P., Praekelt, U., Debrand, E., Coleman, S., Mazzeo, D., Goult, B.T., Gingras, A.R., Pritchard, C.A., Critchley, D.R. & Monkley, S.J. (2010). "Studies on the morphology and spreading of human endothelial cells define key inter- and intramolecular interactions for talin1". *Eur J Cell Biol.*, 89(9), 661-673. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.05.003.
- Kouzarides, T., (2007). "Chromatin modifications and their function". *Cell*, 128, 693-705.
- Kundakovic, M., Gudsnuk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R.L., Perera, F.P. & Champagne, F.A. (2013). "Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure". *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(24), 9956-9961. doi: 10.1073/pnas.1214056110.
- Kundakovic, M. & Champagne, F.a., (2011). "Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A". *Brain. Behav. Immun.*, 25, 1084–1093.
- Kurebayashi, H., Nagatsuka, S., Nemoto, H., Noguchi, H. & Ohno, Y. (2005). "Disposition of low doses of 14C-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats". *Archives of Toxicology*, 79, 243–252
- Kurebayashi, H., Harada, R., Stewart, R.K., Numata, H. & Ohno, Y. (2002). "Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys". *The Journal of Toxicological Sciences*, 68(1), 32-42.

-Kyong, M., Joo, M., Kyung, I., Do, Y., Young, H., Jae, K., Hee, S., Cho, Y., Cho, B., Soo, K., Jang, H. & Joo, Y. (2012). "Bisphenol A Impairs Mitochondrial Function in the Liver at Doses below the No Observed Adverse Effect Level". *Journal of Korean Medical Science*, 27(6), 644–652.

-La Rocca, C., Tait, S., Guerranti, C., Busani, L., Ciardo, F., Bergamasco, B., Perra, G., Mancini, F.R., Marci, R., Bordi, G., Caserta, D., Focardi, S., Moscarini, M. & Mantovani, A. (2015). "Exposure to Endocrine Disruptors and Nuclear Receptors Gene Expression in Infertile and Fertile Men from Italian Areas with Different Environmental Features". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(10), 12426-12445. doi: 10.3390/ijerph121012426.

-Lamorte, L., Rodrigues, S., Sangwan, V., Turner, C. E. & Park, M. (2003). "Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/beta-PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts". *Mol. Biol. Cell.*, 14, 2818-2831.

-Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. & Kemler, R. (1994). "E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(17), 8263–8267.

-Lassen, T.H., Frederiksen, H., Jensen, T.K., Petersen, J.H., Joensen, U.N., Main, K.M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., Jorgensen, N. & Andersson, A.M. (2014). "Urinary Bisphenol A levels in young men: Association with reproductive hormones and semen quality". *Environmental Health Perspectives*, 122, 478–484.

-Lawson, C. & Schlaepfer, D.D. (2012). "Integrin adhesions: who's on first? What's on second? Connections between FAK and talin". *Cell Adh Migr.*, 6(4), 302-306. doi: 10.4161/cam.20488.

-Leach, L., Lammiman, M.J., Babawale, M.O., Hobson, S.A., Bromilou, B., Lovat, S. & Simmonds, M.J. (2000). "Molecular organization of tight and adherens junctions in the human placental vascular tree". *Placenta*, 21(5-6), 547-557.

-Lessey, B.A. (2003). "Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception". *Steroids*, 68, 809–815.

-Lessey, B.A. (2000a). "The role of the endometrium during embryo implantation". *Human Reproduction*, 15(6), 39-50.

- Lessey, B.A. (2000b). "Endometrial receptivity and the window of implantation". *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14, 775–788.
- Lessey, B.A., Castelbaum, A.J., Wolf, L., Greene, W., Paulson, M., Meyer, W.R. & Fritz, M.A. (2000). "Use of integrins to date the endometrium". *Fertility and Sterility*, 73, 779-787.
- Lessey, B.A., Damjanovich, L., Coutifaris, C., Castelbaum, A., Albelda, S.M. & Buck, C.A. (1992). "Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle". *The Journal of Clinical Investigation*, 90, 188-195.
- Lewis, R.C., Meeker, J.D., Peterson, K.E., Lee, J.M., Pace, G.G., Cantoral, A. & Téllez-Rojo, M.M. (2013). "Predictors of urinary bisphenol A and phthalate metabolite concentrations in Mexican children." *Chemosphere*, 93(10), 2390-2398. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.08.038.
- Li, Q., Davila, J., Bagchi, M.K. & Bagchi, I.C. (2016). "Chronic exposure to bisphenol a impairs progesterone receptor-mediated signaling in the uterus during early pregnancy". *Receptors Clin Investig*. 3(3), e1369. doi: 10.14800/rci.1369.
- Li, G., Chang, H., Xia, W., Mao, Z., Li, Y. & Xu, S. (2014). "F0 maternal BPA exposure induced glucose intolerance of F2 generation through DNA methylation change in Gck". *Toxicol Lett.*, 228(3), 192-199. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.04.012.
- Li, D.K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E. & Yuan, W. (2011). "Urine Bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality". *Fertility and Sterility*, 95, 625–630. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.026.
- Li, M.W., Mruk, D.D., Lee, W.M., Cheng, C.Y. (2009). "Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics?". *Int J Biochem Cell Biol.*, 41(11), 2302-2314. doi: 10.1016/j.biocel.2009.05.016.
- Li, Q., Wang, J., Armant, D.R., Bagchi, M.K. & Bagchi, I.C. (2002). "Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation". *J Biol Chem.*, 277(48), 46447–46455.
- Liu, Y. & Xing, F.Q. (2003). "Expression of E-cadherin in human embryo". *Chinese Journal of Medical Genetics*, 20(4), 348-349.

- Lindenberg, S., Hyttel, P., Lenz, S. & Holmes, P.V. (1986). "Ultrastructure of the early human implantation in vitro". *Human Reproduction*, 1, 533–538.
- Lindsay, L.A., Dowland, S.N. & Murphy, C.R. (2016). "Uterine focal adhesions are retained at implantation after rat ovarian hyperstimulation". *Reproduction*, 152(6), 753-763.
- López-Cervantes, J. & Paseiro-Losada, P. (2003), "Determination of Bisphenol A and its migration from, PVC stretch film used for food packaging". *Food Additives and Contaminants*, 20(6), 596-606.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C. & Skinner, M.K., (2013). "Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations". *PLoS ONE*, 8(1), e55387.
- Mao, Z., Xia, W., Chang, H., Huo, W., Li, Y. & Xu, S. (2015). "Paternal BPA exposure in early life alters Igf2 epigenetic status in sperm and induces pancreatic impairment in rat offspring". *Toxicology Letters*, 238(3), 30-38.
- Markey, C.M., Coombs, M.A., Sonnenschein, C. & Soto, A.M. (2003). "Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs". *Evolution & Development*, 5, 67-75.
- Markey, C.M., Luque, E.H., Munoz De Toro, M., Sonnenschein, C. & Soto, A.M. (2001). "In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland". *Biology of Reproduction*, 65, 1215–1223.
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M.R. & Albiges-Rizo, C. (2001). "Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides". *J Biol Chem.*, 276(24), 21217-21227.
- Martínez-Peña, A.A., Rivera-Baños, J., Méndez-Carrillo, L.L., Ramírez-Solano, M.I., Galindo-Bustamante, A., Páez-Franco, J.C., Morimoto, S., González-Mariscal, L., Cruz, M.E. & Mendoza-Rodríguez, C.A. (2017). "Perinatal administration of bisphenol A alters the expression of tight junction proteins in the uterus and reduces the implantation rate". *Reproductive Toxicology*, 69, 106-120. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.02.009.

- Martínez-Peña, A.A. (2014). "Efecto del disruptor endócrino Bisfenol-A sobre la ovulación, fertilización e implantación en roedores. Estudio de las proteínas de las uniones estrechas involucradas en la implantación". *Tesis*. Facultad de Química, UNAM.
- Mateo, M., Generous, A., Sinn, P. L. & Cattaneo, R. (2015). "Connections matter – how viruses use cell–cell adhesion components". *J Cell Sci.*, *128*, 431-439.
- Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G.L., Morita, M. & Kawamoto, T. (2003). "Bisphenol A levels in human urine". *Environmental Health Perspectives*, *111*, 101–104.
- Matsumoto, J., Yokota, H. & Yuasa, A. (2002). "Developmental increase in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decrease during pregnancy". *Environmental Health Perspectives*, *110*, 193–196.
- Mazaki, Y., Hashimoto, S. & Sabe, H. (1997). "Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins". *J. Biol. Chem.*, *272*, 7437-7444.
- Medlock, K.L., Branham, W.S. & Sheehan, D.M. (1995). "The effects of phytoestrogens on neonatal rat uterine growth and development." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *208*(3), 307-313.
- Meeker, J.D., Ehrlich, S., Toth, T.L., Wright, D.L., Calafat, A.M., Trisini, A.T., Ye, X. & Hauser, R. (2010). "Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic". *Reproductive Toxicology*, *30*, 532–539. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.07.005
- Mendoza-Rodríguez, C.A., García-Guzmán, M., Baranda-Avila, N., Morimoto, S., Perrot-Appinat, M. & Cerbón, M. (2011). "Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring". *Reproductive Toxicology*, *31*(2), 177-183. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.10.013.
- Mendoza-Rodríguez, C.A., González-Mariscal, L. & Cerbón, M. (2005). "Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle". *Cell Tissue Res.*, *319*(2), 315-330.
- Merviel, P., Challier, J.C., Carbillon, L., Foidart, J.M. & Uzan, S. (2001). "The role of integrins in human embryo implantation". *Fetal Diagnosis and Therapy*, *16*(6), 364-371.

- Miyawaki, J., Sakayama, K., Kato, H., Yamamoto, H. & Masuno, H., (2007). "Perinatal and postnatal exposure to bisphenol A increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice". *J. Atheroscler. Thromb.*, 14, 245–252.
- Moes, M., Rodius, S., Coleman, S.J., Monkley, S.J., Goormaghtigh, E., Tremuth, L., Kox, .C, van der Holst, P.P., Critchley, D.R. & Kieffer, N. (2007). "The integrin binding site 2 (IBS2) in the talin rod domain is essential for linking integrin beta subunits to the cytoskeleton". *J Biol Chem.*, 282(23), 17280-17288.
- Mofrad, M.R.K. & Kamm, R.D. (2006). "Introduction, with the biological basis for cell mechanics" in *Cytoskeletal Mechanics: MODELS AND MEASUREMENTS*. Cambridge University Press, 1-17.
- Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P.L., Petrozza, J., Wright, D.L., Calafat, A.M., Ye, X. & Hauser, R. (2010). "Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF". *International Journal of Andrology*, 33(2), 385-393.
- Morgan, H.D., Sutherland, H.G., Martin, D.I. Whitelaw, E. (1999). "Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse". *Nat Genet.*, 23(3), 314-318.
- Movaghar, B. & Askarian, S. (2012). "Expression of e-cadherin, leukemia inhibitory factor and progesterone receptor in mouse blastocysts after ovarian stimulation". *Cell J.*, 14(3), 225-230.
- Murphy, C.R. (2000a). "Junctional barrier complexes undergo major alterations during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells". *Human Reproduction*, 15(3), 182-188.
- Murphy, C.R., Hosie, M.J. & Thompson, M.B. (2000b). "The plasma membrane transformation facilitates pregnancy in both reptiles and mammals". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 127(4), 433-439.
- Murphy, C.R. & Shaw, T.J. (1994). "Plasma membrane transformation: a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period". *Cell Biology International*, 18(12), 1115-1128.
- Murphy, C.R. (1993). "The plasma membrane of uterine epithelial cells: structure and histochemistry". *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 27(3), 1-66.

- Murphy, C.R., Swift, J.G., Need, J.A., Mukherjee, T.M. & Rogers, A.W. (1982). "A freeze-fracture electron microscopic study of tight junctions of epithelial cells in the human uterus". *Anat Embryol (Berl)*, 163(4), 367-370.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M. & Welshons, W.V. (1997). "Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol". *Environmental Health Perspectives*, 105, 70–76.
- Nakagawa, Y. & Suzuki, T. (2001). "Metabolism of bisphenol A in isolated rat hepatocytes and oestrogenic activity of a hydroxylated metabolite in MCF-7 human breast cancer cells". *Xenobiotica*, 31(3), 113-123.
- Nallasamy, S., Li, Q., Bagchi, M.K. & Bagchi, I.C. (2012). "Msx homeobox genes critically regulate embryo implantation by controlling paracrine signaling between uterine stroma and epithelium". *PLoS Genet.*, 8(2), e1002500.
- Nava, K., Mendoza-Rodríguez, C.A., Romano-Riquer, P. & Cerbón, M.A. (2008). "Impacto endocrino de sustancias químicas de uso común". *Revista de Educación Química segunda época*, 19(1), 27-33.
- Nayal, A., Webb, D.J. & Horwitz, A.F. (2004). "Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics". *Curr Opin Cell Biol.*, 16(1), 94-98.
- Newbold, R.R., Jefferson, W.N. & Padilla-Banks, E. (2009). "Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life". *Environmental Health Perspectives*, 117, 879–885.
- Newbold, R.R., Jefferson, W.N. & Padilla-Banks, E. (2007). "Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract". *Reprod Toxicol.*, 24(2), 253–258.
- Newbold, R.R., Hanson, R.B., Jefferson, W.N., Bullock, B.C., Haseman, J., McLachlan, J.A. (2000). "Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol". *Carcinogenesis*, 21, 1355–1363. doi: 10.1093/carcin/21.7.1355.

- Nicholson, M.D., Lindsay, L.A. & Murphy, C.R. (2012). "Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy". *Acta Histochem.*, 112(1), 42-52. doi: 10.1016/j.acthis.2008.07.003.
- Niggli, V., Kaufmann, S., Goldmann, W.H., Weber, T., Isenberg, G. (1994). "Identification of functional domains in the cytoskeletal protein talin". *Eur J Biochem.*, 224(3), 951-957.
- Nikolopoulos, S.N. & Turner, C.E. (2001). "Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions". *J. Biol. Chem.*, 276, 23499-23505.
- Nishiyama, T., Ogura, K., Nakano, H., Kaku, T., Takahashi, E., Ohkubo, Y., Sekine, K. & Hiratsuka, A. (2002) "Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferase". *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 17, 221–228.
- Nobes, C. D. & Hall, A. (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia". *Cell*, 81, 53-62.
- Orchard, M.D. & Murphy, C.R. (2002). "Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat". *Acta Histochem.*, 104(2), 149-155.
- Otsuka, H., Sugimoto, M., Ikeda, S. & Kume, S. (2012). "Effects of bisphenol A administration to pregnant mice on serum Ca and intestinal Ca absorption". *Anim Sci J.*, 83(3), 232-237. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00947.x.
- Padmanabhan, V., Siefert, K., Ransom, S., Johnson, T., Pinkerton, J., Anderson, L., Tao, L. & Kannan, K. (2008). "Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem?". *Journal of Perinatology*, 28(4), 258–263.
- Pan, X., Wang, X., Wang, Z., Wang, X., Dou, Z. & Li, Z. (2015). "Bisphenol A influences blastocyst implantation via regulating integrin $\beta 3$ and trophinin expression levels". *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20035-20045.
- Papagrigoriou, E., Gingras, A.R., Barsukov, I.L., Bate, N., Fillingham, I.J., Patel, B., Frank, R., Ziegler, W.H., Roberts, G.C., Critchley, D.R. & Emsley, J. (2004). "Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle". *EMBO J.*, 23(15), 2942-2951.

- Paria, B.C., Zhao, X., Das, S.K., Dey, S.K. & Yoshinaga, K. (1999c). "Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization". *Dev Biol.*, 208(2), 488–501.
- Parr, E.L., Tung, H.N. & Parr, M.B. (1987). "Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats". *Biol Reprod.*, 36(1), 211–225.
- Perez-Alvarado, G. C., Miles, C., Michelsen, J. W., Louis, H. A., Winge, D. R., Beckerle, M. C. & Summers, M. F. (1994). "Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP". *Nat. Struct. Biol.*, 1, 388-398.
- Perry, J. K., Lins, R. J., Lobie, P. E. & Mitchell, M. D. (2009). "Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy". *Clinical Science*, 118 (7), 451-457.
- Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C.E., Thiery, J.P. & Valles, A.M. (2000). "Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells". *J. Cell Biol.*, 148, 957-970.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D.J. & Ginsberg, M.H. (1988). "Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins". *J Biol Chem.*, 273(11), 6104-6109.
- Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z. & Waechter, J.M. (2000). "The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration". *The Journal of Toxicological Sciences*, 54(1), 3-18.
- Raftopoulou, M. & Hall, A. (2004). "Cell migration: Rho GTPases lead the way". *Dev. Biol.*, 265, 23-32.
- Rahman, M.S., Kwon, W.S., Lee, J.S., Yoon, S.J., Ryu, B.Y. & Pang, M.G. (2015). "Bisphenol-A Affects Male Fertility via Fertility-related Proteins in Spermatozoa". *Scientific Reports*, 5, 9169. doi:10.1038/srep09169.
- Rahnama, F., Thompson, B., Steiner, M., Shafiei, F., Lobie, P.E. & Mitchell, M.D. (2009). "Epigenetic regulation of E-cadherin controls endometrial receptivity". *Endocrinology*, 150(3), 1466-1472. doi: 10.1210/en.2008-1142.

- Rajabi, N., Thorpe, J.B., Foster, W.G. & deCatanzaro, D. (2014). "Novel male exposure reduces uterine e-cadherin, increases uterine luminal area, and diminishes progesterone levels while disrupting blastocyst implantation in inseminated mice". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 107-113.
- Reardon, S.N., King, M.L., MacLean, J.A., Mann, J.L., DeMayo, F.J., Lydon, J.P. & Hayashi, K. (2012). "Cdh1 Is Essential for Endometrial Differentiation, Gland Development, and Adult Function in the Mouse Uterus". *Biol Reprod.*, 86(5), 141.
- Reddy, K.V. & Mangale, S.S. (2003). "Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function". *Tissue Cell*, 35, 260–273.
- Reed, M.J., Purohit, A., Woo, L.W., Newman, S.P. & Potter, B.V. (2005). "Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition". *Endocrine Reviews*, 26, 171–202.
- Rees, D.J.G., Ades, S.E., Singer, S.J. & Hynes, R.O. (1990). "Sequence and domain structure of talin". *Nature*, 347, 685–689.
- Reik, W. (2007). "Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development". *Nature*, 447, 425–432.
- Repetto-Jiménez, M. & Repetto-Kuhn, G. (2009). "Toxicología fundamental"; *Ediciones Díaz de Santos*; España.
- Reuss, B., Hellmann, P., Dahl, E., Traub, O., Butterweck, A., Grümmer, R. & Winterhager, E. (1996). "Connexins and E-cadherin are differentially expressed during trophoblast invasion and placenta differentiation in the rat". *Developmental Dynamics*, 205(2), 172-182.
- Richard, K., Hume, R., Kaptein, E., Stanley, E.L., Visser, T.J. & Coughtrie, M.W. (2001). "Sulfation of thyroid hormone and dopamine during human development: ontogeny of phenol sulfotransferases and arylsulfatase in liver, lung, and brain". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 2734-2742.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R. & vom Saal, F.S. (2007a). "In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies". *Reproductive Toxicology*, 24, 199–224.
- Ridley, A. J. (2001b). "Rho GTPases and cell migration". *J. Cell Sci.*, 114, 2713-2722.

- Riethmacher, D., Brinkmann, V. & Birchmeier, C. (1995). "A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), 855-859.
- Roy, S.K., Sengupta, J. & Manchanda, S.K. (1983). "Histochemical study of beta-glucuronidase in the rat uterus during implantation and pseudopregnancy". *Journal of Reproduction and Fertility*, 68(1),161-164.
- Rubin, B.S. (2011). "Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects". *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127, 27–34.
- Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C. & Soto, A.M. (2001). "Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels". *Environmental Health Perspectives*, 109, 675-680.
- Rudel, R.A., Gray, J.M., Engel, C.L., Rawsthorne, T.W., Dodson, R.E., Ackerman, J.M., Rizzo, J., Nudelman, J.L. & Brody, J.G. (2011). "Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention". *Environmental Health Perspectives*, 119(7), 914–920. doi: 10.1289/ehp.1003170.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 697–715.
- Ruoslahti, E. (1991). "Integrins". *The Journal of Clinical Investigation*, 87(1), 1–5.
- Ryan, B.C. & Vandenberg, J.G. (2006). "Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice". *Hormones and Behavior*, 50, 85–93.
- Sakamoto, H., Yokota, H., Kibe, R., Sayama, Y. & Yuasa, A. (2002). "Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573(2), 171-176.
- Sakkas, D. (2011). "A soluble molecule secreted by human blastocysts modulates regulation of HOXA10 expression in an epithelial endometrial cell line". *Endocrinology*, 152(3), 1101-11. doi: 10.1210/en.2009-1037.

- Salian, S., Doshi, T. & Vanage, G. (2009). "Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A". *Life Sciences*, 85(1-2), 11-18. doi: 10.1016/j.lfs.2009.04.005.
- Salian, S., Doshi, T. & Vanage, G. (2009a). "Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring". *Life Sciences*, 85(21-22), 742-752. doi: 10.1016/j.lfs.2009.10.004.
- Salian, S., Doshi, T. & Vanage, G. (2009b). "Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of Sertoli cell junctional proteins in the testis". *Toxicology*, 265(1-2), 56-67. doi: 10.1016/j.tox.2009.09.012.
- Sánchez, L., Hernández, V. & López, R. (2005). "Papel de las cadherinas en la metástasis". *REB*, 24(3,4), 97-103.
- Schaller, M.D. (2001). "Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein". *Oncogene*, 20(44), 6459-6472.
- Schaller, M. D. & Parsons, J. T. (1995). "pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk". *Mol. Cell. Biol.*, 15, 2635-2645.
- Schlafke, S. & Enders, A.C. (1975). "Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation". *Biol Reprod.*, 12(1), 41-65.
- Schmeichel, K. L. & Beckerle, M. C. (1994). "The LIM domain is a modular protein-binding interface". *Cell*, 79, 211-219.
- Schneeberger, E.E., & Lynch, R.D. (1992). "Structure, function and regulation of cellular tight junctions". *Am J Physiol*, 262, L647-L661.
- Schönfelder, G., Friedrich, K., Paul, M. & Chahoud, I. (2004). "Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol A on the uterus of rat offspring". *Neoplasia*, 6, 584-594.
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M. & Chahoud, I. (2002a). "Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit". *Environmental Health Perspectives*, 110, A703-A707.

- Schönfelder, G., Flick, B., Mayr, E., Talsness, C., Paul, M. & Chahoud, I. (2002b). "In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina". *Neoplasia*, 4, 98–102.
- Sefton, M., Johnson, M.H., Clayton, L. (1992). "Synthesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development". *Development*, 115(1), 313-318.
- Senyildiz, M., Karaman, E.F., Bas, S.S., Pirincci, P.A. & Ozden, S. (2017). "Effects of BPA on global DNA methylation and global histone 3 lysine modifications in SH-SY5Y cells: An epigenetic mechanism linking the regulation of chromatin modifying genes". *Toxicol In Vitro.*, 44, 313-321. doi: 10.1016/j.tiv.2017.07.028.
- Sero, J.E., German, A.E., Mammoto, A. & Ingber, D.E. (2012). "Paxillin controls directional cell motility in response to physical cues". *Cell Adh Migr.*, 6(6), 502-508. doi: 10.4161/cam.21672.
- Shattil, S.J., Kim, C. & Ginsberg, M.H. (2010). "The final steps of integrin activation: the end game". *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(4), 288-300. doi: 10.1038/nrm2871.
- Sheth, B., Moran, B., Anderson, J. M. & Fleming, T. P. (2000b). "Post-translational control of occludin of membrane assembly in mouse trophoectoderm: a mechanism to regulate timing of tight junction biogenesis and blastocyst formation". *Development*, 127, 831-840.
- Shibata, N., Matsumoto, J., Nakada, K., Yuasa, A. & Yokota, H. (2002). "Male-specific suppression of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase activities toward sex hormones in the adult male rat administered bisphenol A". *Biochemical Journal*, 368(3), 783-788.
- Shimizu, M., Ohta, K., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Ohno, Y. & Ozawa, S. (2002). "Sulphation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells". *Toxicology in Vitro*, 16, 549-556.
- Shion, Y.L. & Murphy, C.R. (1995). "The basal plasma membrane and lamina densa of uterine epithelial cells are both altered during early pregnancy and by ovarian hormones in the rat". *Eur J Morphol.*, 33(3), 257-264.
- Shirane, A., Wada-Hiraike, O., Tanikawa, M., Seiki, T., Hiraike, H., Miyamoto, Y., Sone, K., Hirano, M., Oishi, H., Oda, K., Kawana, K., Nakagawa, S., Osuga, Y., Fujii, T., Yano,

- T., Kozuma, S. & Taketani, Y. (2012). "Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(3), 604-610. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.160.
- Simón, C., Moreno, C., Remohí, J. & Pellicer, A. (1998). "Molecular interactions between embryo and uterus in the adhesion phase of human implantation". *Human Reproduction*, 13(3), 219-232, discussion 233-236.
- Singh, S. & Li, S.S., (2012). "Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates". *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 10143–10153.
- Slater, M., Murphy, C.R. & Barden, J.A. (2002). "Tenascin, E-cadherin and P2X calcium channel receptor expression is increased during rat blastocyst implantation". *The Histochemical Journal*, 34(1-2), 13-19.
- Snir, A., Brenner, B., Paz, B. & Lanir, N. (2010). "Presence of Integrin alpha(IIb)beta 3 in early gestation human trophoblasts: possible involvement of fibrin as a matrix ligand". *Thrombosis Research*, 125(3), 253-256. doi: 10.1016/j.thromres.2009.11.022
- Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C. & Fennell, T.R. (2000). "Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168(3), 225-34.
- Song, H., Han, K. & Lim, H. (2007). "Progesterone supplementation extends uterine receptivity for blastocyst implantation in mice". *Reproduction*, 133(2), 487-493.
- Souter, I., Smith, K.W., Dimitriadis, I., Ehrlich, S., Williams, P.L., Calafat, A.M. & Hauser, R. (2013). "The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments". *Reproductive Toxicology*, 42, 224-231.
- Spencer, F., Chi, L., Zhu, M.X., Nixon, E. & Lemelle, C. (2002). "Uterine molecular responses to bisphenol A treatment before and after decidual induction in pseudopregnant rats". *Int J Hyg Environ Health.*, 204(5-6), 353-357.
- Srinivasan, K.R., Blesson, C.S., Fatima, I., Kitchlu, S., Jain, S.K., Mehrotra, P.K., Dwivedi, A. (2009). "Expression of alphaVbeta3 integrin in rat endometrial epithelial cells and its

functional role during implantation". *General and Comparative Endocrinology*, 160(2), 124-133. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.10.021.

-Srinivasan, K.R., Dwivedi, A., Jain, S.K. & Mehrotra, P.K. (2006). "Demonstration of uterine receptivity in vitro by co-culture of rat epithelial cells and blastocyst". *Cell and Tissue Research*, 325(1), 135-141.

-Staun-Ram, E. & Shalev, E. (2005). "Human trophoblast function during the implantation process". *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3, 56.

-Strassburg, C.P., Strassburg, A., Kneip, S., Barut, A., Tukey, R.H., Rodeck, B. & Manns, M.P. (2002). "Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults". *Gut*, 50, 259-265.

-Subauste, M. C., Pertz, O., Adamson, E. D., Turner, C. E., Junger, S. & Hahn, K. M. (2004). "Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility". *J. Cell Biol.*, 165, 371-381.

-Sueoka, K., Shiokawa, S., Miyazaki, T., Kuji, N., Tanaka, M. & Yoshimura, Y. (1997). "Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation". *Fertility and Sterility*, 67(5), 799-811.

-Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T. & Suzumori, K. (2005). "Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage". *Human Reproduction*, 20, 2325-2329.

-Suiko, M., Sakakibara, Y. & Liu, M.C. (2000). "Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267, 80-84.

-Tachibana, T., Wakimoto, Y., Nakamuta, N., Phichitraslip, T., Wakitani, S., Kusakabe, K., Hondo, E. & Kiso, Y. (2007). "Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice". *The Journal of Reproduction and Development*, 53(3), 509-514.

-Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H. & Calderwood, D.A. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation". *Science*, 302(5642), 103-106.

- Takao, Y., Lee Ho, C., Kohra, S. & Arizono, K. (2002). "Release of BPA from food can lining upon heating". *The Journal of Health Sciences*, 48, 331-334.
- Tammen, S.a., Friso, S. & Choi, S.W., (2013). "Epigenetics: the link between nature and nurture". *Mol. Aspects Med.*, 34, 753–764.
- Taylor, J.A., Welshons, W.V. & vom Saal, F.S. (2008). "No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24 hr after administration in neonatal female mice". *Reproductive Toxicology*, 25(2), 169-176.
- Thie, M., Rospel, R., Dettmann, W., Benoit, M., Ludwig, M., Gaub, H.E. & Denker, H.W. (1998). "Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces". *Hum Reprod.*, 13(11), 3211–3219.
- Thie, M., Fuchs, P. & Denker, H.W. (1996). "Epithelial cell polarity and embryo implantation in mammals". *Int J Dev Biol.*, 40(1), 389–393.
- Thie, M., Harrach-Ruprecht, B., Sauer, H., Fuchs, P., Albers, A. & Denker, H.W. (1995). "Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity". *European Journal of Cell Biology*, 66(2), 180-191.
- Thomas, F.C., Sheth, B., Eckert, J.J., Bazzoni, G., Dejana, E. & Fleming, T.P. (2004). "Contribution of JAM-1 to epithelial differentiation and tight-junction biogenesis in the mouse preimplantation embryo". *Journal of Cell Science*, 117(23), 5599-5608.
- Tiwari, D. & Vanage, G. (2013). "Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility". *Reproductive Toxicology*, 40, 60-68. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.05.013.
- Tiwari, R., Mehrotra, P.K. & Srivastava, A. (2004). "Implantation in vitro: co-culture of rat blastocyst and epithelial cell vesicles". *Cell and Tissue Research*, 315(2), 271-277.
- Tobacman, J.K., Hinkhouse, M. & Khalkhali-Ellis, Z. (2002). "Steroid sulfatase activity and expression in mammary myoepithelial cells". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 65–68.
- Todaka, E. & Mori, C. (2002). "Necessity to establish new risk assessment and risk communication for human fetal exposure to multiple endocrine disruptors in Japan". *Congenital Anomalies*, 42, 87–93.

- Tranguch, S., Daikoku, T., Guo, Y., Wang, H. & Dey, S.K. (2005b). "Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation". *Cell Mol Life Sci.*, 62(17), 1964–1973.
- Trejo, A. (2008). "Cadherina-Cadherina: mecanismo de adhesión". *Laboratorio de reproducción animal asistida*. Depto de Biología de la reproducción. UAM.
- Tsubouchi, A., Sakakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H. & Sabe, H. (2002). "Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118- phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration". *J. Cell Biol.*, 159, 673-683.
- Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001). "Multifunctional strands in tight junctions". *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(4), 285-293.
- Tsutsumi, O. (2005). "Assessment of human contamination of estrogenic endocrine disrupting chemicals and their risk for human reproduction". *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 93, 325–330.
- Tumbarello, D.A., Brown, M.C., Hetey, S.E. & Turner, C.E. (2005). "Regulation of paxillin family members during epithelial-mesenchymal transformation: a putative role for paxillin delta". *J Cell Sci.*, 118(20), 4849-4863.
- Tumbarello, D.A., Brown, M.C. & Turner, C.E. (2002). "The paxillin LD motifs". *FEBS Lett.*, 513(1), 114-118.
- Turner, B.M., (2002). "Cellular memory and the histone code". *Cell*, 111, 285–291.
- Turner, C. E. (2000). "Paxillin and focal adhesion signaling". *Nat. Cell. Biol.*, 2, E231-E236.
- Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S. & Leventhal, P. S. (1999). "Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling". *J. Cell Biol.*, 145, 851-863.
- Turner, C. E. & Miller, J. T. (1994). "Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region". *J. Cell Sci.*, 107, 1583-1591.

- Turner, C. E., Glenney, J. R., Jr & Burridge, K. (1990). "Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions". *J. Cell Biol.*, 111, 1059-1068.
- Ueda, O., Yorozu, K., Kamada, N., Jishage, K., Kawase, Y., Toyoda, Y. & Suzuki, H. (2003). "Possible expansion of "Window of Implantation" in pseudopregnant mice: time of implantation of embryos at different stages of development transferred into the same recipient". *Biol Reprod.*, 69(3), 1085–1090.
- Upmeier, A., Degen, G.H., Diel, P., Michna, H. & Bolt, H.M. (2000). "Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration". *Toxicokinetics And Metabolism. Archives of Toxicology*, 74(8), 431-436.
- Van-Itallie, C.M. & Anderson, J.M. (1997). "Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts". *J Cell Sci.*, 110 (9), 1113-1121.
- Vandenberg, L.N. (2014). "Non-Monotonic Dose Responses in Studies of Endocrine Disrupting Chemicals: Bisphenol A as a Case Study". *Dose Response*, 12(2), 259–276.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R. Jr., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T. & Myers, J.P. (2012). "Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses". *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-455. doi: 10.1210/er.2011-1050.
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N. & Welshons, W.V. (2007). "Human exposure to bisphenol A (BPA)". *Reproductive Toxicology*, 24, 139–177.
- Varayoud, J., Ramos, J.G., Bosquiazzo, V.L., Lower, M., Muñoz-de-Toro, M. & Luque, E.H. (2011). "Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites". *Endocrinology*, 152(3), 1101-1111.
- Verbanck, M., Canouil, M., Leloire, A., Dhennin, V., Coumoul, X., Yengo, L., Froguel, P. & Poulain-Godefroy, O. (2017). "Low-dose exposure to bisphenols A, F and S of human primary adipocyte impacts coding and non-coding RNA profiles". *PLoS One.*, 12(6), e0179583. doi: 10.1371/journal.pone.0179583.

- Vestweber, D. & Kemler, R. (1984). "Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin". *Cell Differ.*, 15(2-4), 269-273.
- Vigezzi, L., Bosquiazzo, V.L., Kass, L., Ramos, J.G., Muñoz-de-Toro, M. & Luque, E.H. (2015). Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment. *Reprod Toxicol.*, 52, 83–92.
- Vitku, J., Heracek, J., Sosvorova, L., Hampl, R., Chlupacova, T., Hill, M., Sobotka, V., Bicikova, M. & Starka, L. (2016). "Associations of bisphenol A and polychlorinated biphenyls with spermatogenesis and steroidogenesis in two biological fluids from men attending an infertility clinic". *Environment International*, 89-90, 166-173. doi: 10.1016/j.envint.2016.01.021.
- Völkel, W., Bittner, N. & Dekant, W. (2005). "Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Drug Metabolism and Disposition*, 33(11), 1748-1757.
- Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G. & Dekant, W. (2002). "Metabolism and kinetics of Bisphenol A in humans at low doses following oral administration". *Chemical Research in Toxicology*, 15(10), 1281-1287.
- Vom Saal, F.S., Akingbemi, B.T., Belcher, S.M., Birnbaum, L.S., Crain, D.A., Eriksen, M., Farabollini, F., Guillette, L.J. Jr., Hauser, R., Heindel, J.J., Ho, S.M., Hunt, P.A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Keri, R.A., Knudsen, K.E., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Marcus, M., McLachlan, J.A., Myers, J.P., Nadal, A., Newbold, R.R., Olea, N., Prins, G.S., Richter, C.A., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Vandenberg, L.N., Walser-Kuntz, D.R., Watson, C.S., Welshons, W.V., Wetherill, Y. & Zoeller, R.T. (2007). "Chapel Hill Bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure". *Reproductive Toxicology*, 24, 131–138.
- Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S. & Welshons, W.V. (1998). "A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior". *Toxicology & Industrial Health*, 14, 239–260.

- Vuori, K. (1998). "Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions". *J Membr Biol.*, 165(3), 191-199.
- Wang, T., Han, J., Duan, X., Xiong, B., Cui, X.S., Kim, N.H., Liu, H.L. & Sun, S.C. (2016). "The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro". *Oncotarget.*, 7(22), 32554-32565. doi: 10.18632/oncotarget.8689.
- Wang, Z.Y., Lu, J., Zhang, Y.Z., Zhang, M., Liu, T., Qu, X.L. (2015). "Effect of Bisphenol A on invasion ability of human trophoblastic cell line BeWo". *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), 14355-14364.
- Wang, P., Ballestrem, C., Streuli, C.H. (2011). "The C terminus of talin links integrins to cell cycle progression". *J Cell Biol.*, 195(3), 499-513. doi: 10.1083/jcb.201104128.
- Wang, H. & Dey, S.K. (2006). "Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models". *Nat Rev Genet.*, 7(3), 185–199.
- Wang, X., Matsumoto, H., Zhao, X., Das, S.K. & Paria, B.C. (2004d). "Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation". *J Cell Sci.*, 117(1), 53–62.
- Wang, J. & Armant, D.R. (2002). "Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation". *Cells Tissues Organs*, 172(3), 190-201.
- Watson, A.J. & Barcroft, L.C. (2001). "Regulation of blastocyst formation". *Frontiers in Bioscience*, 6, D708-D730.
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. & Horwitz, A. F. (2004). "FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly". *Nat. Cell Biol.*, 6, 154-161.
- Weimar, C. H., Post Uiterweer, E. D., Teklenburg, G., Heijnen, C. J. & Macklon, N. S. (2013). "In-vitro model systems for the study of human embryo–endometrium interactions". *Reproductive BioMedicine Online*, 27, 461-476.
- Welshons, W.V., Nagel, S.C. & vom Saal, F.S. (2006). "Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of Bisphenol A at levels of human exposure". *Endocrinology*, 147(6), S56–S69.

- Weng, Z., Taylor, J. A., Turner, C. E., Brugge, J. S. & Seidel-Dugan, C. (1993). "Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells". *J. Biol. Chem.*, 268, 14956-14963.
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.a., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T. & Belcher, S.M., (2007). "In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action". *Reprod. Toxicol.*, 24, 178-198.
- White, M.D. & Plachta, N. (2015). "How adhesion forms the early mammalian embryo". *Current Topics in Developmental Biology*, 112, 1-17. doi: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.022.
- Wilcox, A.J., Baird, D.D. & Weinberg, C.R. (1999). "Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy". *N Engl J Med.*, 340(23), 1796–1799.
- Wolstenholme, J., Rissman, E. & Connelly, J., (2011). "The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior". *Horm. Behav.*, 59, 296-305.
- Xiao, S., Diao, H., Smith, M.A., Song, X. & Ye, X. (2011). "Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice". *Reprod Toxicol.*, 32(4), 434-441.
- Yamada, K.M. & Geiger, B. (1997). "Molecular interactions in cell adhesion complexes". *Curr Opin Cell Biol.*, 9(1), 76-85.
- Yamaguchi, R., Maki, M., Hatanaka, M. & Sabe, H. (1994). "Unphosphorylated and tyrosine-phosphorylated forms of a focal adhesion protein, paxillin, are substrates for calpain II in vitro: implications for the possible involvement of calpain II in mitosis-specific degradation of paxillin". *FEBS Lett.*, 356, 114-116.
- Yamamoto, T. & Yasuhara, A. (1999). "Quantities of BPA leached from plastic waste samples". *Chemosphere*, 38, 2569- 2576.
- Yamano, Y., Miyakawa, S., Iizumi, K., Itoh, H., Iwasaki, M., Tsugane, S., Kagawa, J., Nakadate, T. (2008). "Long-term study of urinary bisphenol A in elementary school children". *Environ Health Prev Med.*, 13, 332-337.
- Yan, B., Calderwood, D.A., Yaspian, B. & Ginsberg, M.H. (2001). "Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain". *J Biol Chem.*, 276(30), 28164-28170.

- Yang, L., Luo, L., Ji, W., Gong, C., Wu, D., Huang, H., Liu, Q., Xia, B., Hu, G., Zhang, W., Zhang, Q., Liu, J., Zhang, W. & Zhuang, Z. (2013). "Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells". *Toxicol Lett.*, 218(3), 187-193. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.01.026.
- Yang, M., Kim, S.Y., Lee, S.M., Chang, S.S., Kawamoto, T., Jang, J.Y. & Ahn, Y.O. (2003). "Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 546–551.
- Yaoi, T., Itoh, K., Nakamura, K., Ogi, H., Fujiwara, Y. & Fushiki, S. (2008). "Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A". *Biochem Biophys Res Commun.*, 376, 563–567.
- Ye, X., Pierik, F.H., Angerer, J., Meltzer, H.M., Jaddoe, V.W., Tiemeier, H., Hoppin, J.A. & Longnecker, M.P. (2009). "Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)". *Int J Hyg Environ Health*, 212, 481-491
- Ye, X., Pierik, F.H., Hauser, R., Duty, S., Angerer, J., Park, M.M., Burdorf, A., Hofman, A., Jaddoe, V.W., Mackenbach, J.P., Steegers, E.A., Tiemeier, H. & Longnecker, M.P. (2008). "Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study". *Environ Res.*, 108, 260-267.
- Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L.L. & Calafat, A.M. (2006). "Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry". *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 831(1–2), 110-115.
- Ye, X., Hama, K., Contos, J.J., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M.K., Suzuki, H., Amano, T., Kennedy, G., Arai, H., Aoki, J. & Chun, J. (2005). "LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing". *Nature*, 435, 104-108.
- Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H. & Ikushiro, S. (1999). "Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver". *Biochem J.*, 340, 405-409

- Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y. & Nakazawa, H. (2001). "Determination of Bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography". *Food Addit. Contam.*, 18, 69-75.
- Yoshihara, S., Mizutare, T., Makishima, M., Suzuki, N., Fujimoto, N., Igarashi, K. & Ohta S. (2004). "Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency". *Toxicol Sci.*, 78, 50–59.
- Yoshihara, S., Makishima, M., Suzuki, N. & Ohta, S. (2001). "Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction". *Toxicol Sci.*, 62(2), 221-227.
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z. and Geiger, B. (2007b). "A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions". *J. Cell Sci.*, 120, 137-148.
- Zama, A.M. & Uzumcu, M., (2010). "Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective". *Front. Neuroendocrinol.*, 31, 420-439.
- Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H. & Armant, D.R. (2013). "Physiological and molecular determinants of embryo implantation". *Mol Aspects Med.*, 34(5), 939-980. doi: 10.1016/j.mam.2012.12.011.
- Zhang, Y., Wang, Q., Wang, H. & Duan E. (2017). "Uterine Fluid in Pregnancy: A Biological and Clinical Outlook". *Trends in Molecular Medicine* , 23(7) , 604-614.
- Public Health Service Food and Drug Administration. DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES.
<http://www.fda.gov/downloads/NewsEvents/PublicHealthFocus/UCM424266.pdf>
 [Consultado Enero 10, 2018].