



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“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.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

ANNIA ALEJANDRA MARTÍNEZ PEÑA



México, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente:.....M. en C. Lucía Cornejo Barrera

Vocal:.....Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Secretario:.....Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

1er. Suplente:.....Dra. Iliana Elvira González Hernández

2do. Suplente:.....M. en C. Tania Gómez Sierra

Experimento llevado a cabo en el laboratorio con número 206 del edificio "F" de la Facultad de Química; Ciudad Universitaria, U.N.A.M.

Asesora:

Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Sustentante:

Annia Alejandra Martínez Peña

Índice

1) Resumen.....	(1)
2) Introducción.....	(3)
3) Antecedentes.....	(5)
3.1 Generalidades del BPA.....	(5)
3.2 Exposición del ser humano al BPA.....	(6)
3.3 Efectos adversos del BPA sobre la fertilidad.....	(8)
3.3.1 Efectos en humanos.....	(8)
3.3.2 Efectos en animales de experimentación.....	(9)
3.4 Uniones estrechas y su relación con la implantación.....	(14)
4) Planteamiento del problema.....	(19)
5) Hipótesis.....	(19)
6) Objetivo general.....	(20)
6.1 Objetivos particulares.....	(20)
7) Metodología.....	(21)
7.1 Animales de experimentación.....	(21)
7.2 Monitoreo del ciclo estral y apareamiento.....	(21)
7.3 Tratamiento farmacológico de la generación F0.....	(23)
7.4 Caracterización fenotípica de la generación F1.....	(24)
7.5 Cuantificación de BPA en suero.....	(24)
7.6 Evaluación de parámetros reproductivos (GF1).....	(25)
7.7 Procesamiento de los tejidos.....	(26)
7.8 Estudio de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas.....	(27)
7.9 Análisis de los datos.....	(28)

8) Resultados.....	(29)
8.1 Características de gestación y crías de la generación F0	(29)
8.2 DAG al día del destete de la generación F1.....	(30)
8.3 Cambios en el peso corporal de la generación F1....	(31)
8.4 Niveles de BPA en suero de la generación F1.....	(32)
8.5 Evaluación de parámetros reproductivos.....	(34)
8.5.1 Índice de fecundación.....	(34)
8.5.2 Tasas de ovulación.....	(35)
8.5.3 Tasas de implantación.....	(36)
8.5.4 Número de embriones y sitios de reabsorción.....	(37)
8.6 Estudio de la expresión de proteínas de uniones estrechas.....	(39)
8.6.1 Claudina-1.....	(39)
8.6.2 ZO-1.....	(42)
8.6.3 Ocludina.....	(44)
9) Discusión.....	(48)
10) Conclusiones.....	(61)
11) Referencias.....	(64)

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 a nivel molecular a través de los cuales actúan. En el presente proyecto, se administró BPA en dos diferentes dosis a ratas de la cepa Wistar preñadas durante la gestación y posteriormente en la lactancia y se evaluaron diversos parámetros reproductivos de sus crías, que recibieron el compuesto a través de sus madres, comparándolas con un grupo control.

Además de observar cambios significativos en la distancia anogenital (parámetro indicativo del desarrollo sexual) al día del destete de las crías macho de madres tratadas con respecto a las control, se hallaron también niveles superiores de BPA en su suero, comprobando que se transfiere de la madre a la cría durante la gestación y lactancia.

Al madurar las hembras, se evaluó el índice de fecundación para los tres grupos (Control, Dosis Baja: 0.05 mg/kg de pc/día y Dosis Alta: 20 mg/kg de pc/día), siendo el de la dosis alta menor que los otros dos grupos casi en un 10 %.

De igual manera, se observó un decremento significativo en la tasa de implantación del grupo de dosis alta con respecto al control, lo cual indica una posible disminución en su fertilidad.

Por último, se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión de tres proteínas de las uniones estrechas (Claudina-1, ZO-1 y Ocludina) del epitelio luminal uterino que tienen una probable función en el proceso de implantación. Estas diferencias fueron encontradas en los días 1, 3, 6 y 7 de gestación e implican un cambio en la intensidad de expresión y en el patrón de distribución de las proteínas estudiadas en los úteros de las crías de ratas tratadas con respecto a las control.

Los resultados permiten deducir que el BPA, como disruptor endócrino, tiene la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endócrino y, ya que el embarazo es un proceso hormonodependiente, se ve afectado. Estos cambios en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas que están encargadas de regular el transporte paracelular y, por tanto, tienen una amplia influencia sobre el proceso de implantación, podrían estar influenciados por niveles hormonales alterados, siendo esta una posible causa a nivel molecular de la disminución de este parámetro reproductivo.

2. Introducción

El bisfenol-A es un compuesto orgánico actualmente utilizado en la producción de materiales utilizados en la elaboración de curaciones dentales, biberones, recubrimientos internos de latas para alimentos, botellas para bebidas y empaques alimentarios en general.

La importancia de este compuesto en la vida cotidiana reside en dos factores. El primero de éstos 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 significa que las personas que consumen alimentos contenidos en empaques cuyo material contiene BPA, también ingieren el compuesto.

El segundo factor que sustenta la importancia del presente proyecto se relaciona con la actividad del BPA como disruptor endócrino en el humano. Los disruptores endócrinos son sustancias químicas, naturales o artificiales, exógenas al organismo, que tienen la capacidad de alterar la homeostasis de los sistemas endócrino y reproductivo mimetizando la acción de hormonas naturales, como el estradiol, en tejidos hormono dependientes y hormono sensibles y que por tanto son responsables de diversas anormalidades reproductivas (Nava *et al.*, 2008).

De igual manera, hay estudios (Tsutsumi *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2006) que mencionan que el BPA se transmite a través de la leche materna, por lo que los bebés también están expuestos a este compuesto sin tener que consumir directamente el alimento empacado. Además, otras investigaciones demuestran que es justamente en etapas tempranas del desarrollo en las que los humanos son más sensibles a los efectos de este compuesto, teniendo consecuencias irreversibles a largo plazo (Richter *et al.* 2007).

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 en el organismo. En el presente trabajo se estudian los efectos de este compuesto sobre la

funcionalidad reproductiva de las crías (hembras) de ratas Wistar cuando se le ha administrado el compuesto a la madre durante la gestación y la lactancia, así como el efecto que tiene sobre la expresión de las proteínas de las uniones estrechas del epitelio uterino.

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 fenol y acetona, fue sintetizado inicialmente como un estrógeno, sin embargo, actualmente es empleado 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 que no se encuentra este compuesto en la naturaleza, sí es posible encontrarlo 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.

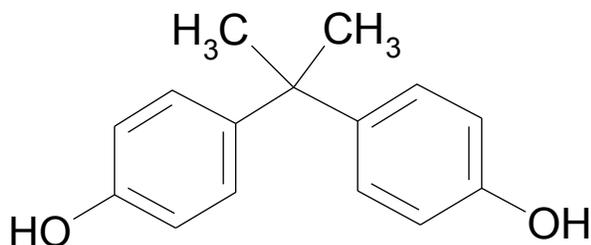


Figura 1. Bisfenol A (BPA).

Como ya se ha mencionado, el bisfenol-A tiene la capacidad de migrar de los polímeros mencionados hacia el alimento contenido en el empaque y esta capacidad de migración aumenta con la exposición a altas temperaturas o 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 del BPA en agua, vinagre y aceite de oliva, por 10 días a 40°C este

es mayor en aceite de oliva. 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).

Se producen anualmente alrededor de 6.5 billones de libras 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, la principal vía de contacto humana con el BPA son los alimentos (López-Cervantes *et al.*, 2003) y es el principal compuesto estrogénico que se fuga a las fuentes de agua y alimento (Vom Saal *et al.*, 2007).

La TDI 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. La TDI también es llamada por las Agencias Regulatoria Estadounidenses como Dosis de Referencia o Dosis de Ingesta Diaria Aceptable o Admisible. Actualmente, la Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA) y la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos, tiene registrada una IDA de 0.05 mg de BPA/kg de peso corporal al día.

3.2 Exposición del ser humano al BPA

Como ya se ha mencionado, la importancia del presente proyecto radica en la creciente exposición de la especie humana al disruptor endócrino bisfenol-A y en los efectos negativos que podría tener este compuesto sobre la salud.

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, sin embargo, solamente se ha realizado un estudio en 60 mujeres; en 80.0% (N = 48) de las pacientes se detectó BPA en orina, cuya concentración presentaba un rango entre 0.4 ng/mL y 6.7 ng/mL (Cantonwine *et al.*, 2010).

El Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos estimó recientemente que casi todos los Americanos (93%) tienen niveles detectables

(≥ 0.1 ng/mL) de BPA en sus cuerpos 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.

Actualmente, la Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA) y la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos, consideran como “segura” para el consumo humano la dosis de 50 μ g de BPA por kg de peso corporal al día, sin embargo, los resultados reportados por Vandenberg *et al.* (2007) llevaron a la conclusión por parte de los científicos que acudieron a la Conferencia sobre BPA convocada por el Instituto Nacional de Salud de EUA (NIH) de que los niveles actuales a los que está expuesto el ser humano exceden esta dosis (Vom Saal *et al.*, 2007). Así mismo, concluyeron que: 1) el BPA es detectado en humanos en niveles de nanogramos por mililitro (ppb); 2) el BPA sin conjugar (bioactivo) se encuentra en sangre y 3) los mismos niveles se encuentran en su forma conjugada (glucoronidada o sulfatada) en orina (Vandenberg *et al.*, 2007; Vom Saal *et al.*, 2007).

Además de la exposición al BPA en etapa adulta, existen estudios que demuestran que los bebés también pueden estar expuestos al BPA al transferirse

por medio de la leche materna (Tsutsumi *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2006). De igual manera, los bebés en unidades neonatales de cuidados intensivos pueden tener una mayor exposición al BPA debido al uso de aditamentos médicos (Calafat *et al.*, 2009).

El ser humano está expuesto al BPA desde las primeras etapas de gestación, ya que se han detectado altos 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 puede cruzar la placenta (Ikezuki *et al.*, 2002; Padmanabhan *et al.*, 2008; Schonfelder *et al.*, 2002; Vandenberg *et al.*, 2007).

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.*, 2007), la exposición durante la gestación y lactancia es de particular interés.

3.3 Efectos adversos del BPA sobre la fertilidad

3.3.1 Efectos en humanos

Actualmente existe una gran preocupación con respecto a qué factores ambientales pueden estar teniendo un impacto negativo en la salud reproductiva femenina debido al decremento en las tasas de embarazo en humanos y el incremento en la ocurrencia de enfermedades como cáncer de mama, infertilidad, insuficiencia ovárica prematura y en general reproductivas en la mujer.

Se ha reportado, en mujeres, una asociación entre un incremento en las concentraciones de BPA 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 reportado 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). De igual forma, se ha

asociado la exposición a BPA con abortos sucesivos (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2005).

También, en un estudio de fertilización in vitro, se ha observado una asociación lineal 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 (Mok-Lin *et al.*, 2010).

En ratones tratados con BPA por vía oral, en dosis comparables con los niveles de exposición ambiental (0.02–0.1 mg/kg/día), se observó que el BPA es un poderoso disruptor de meiosis, llevando a aneuploidía, que es considerada la causa más común conocida del retraso mental, así como la causa genética de infertilidad en humanos (Hassold y Hunt, 2001).

3.3.2 Efectos en animales de experimentación

Los efectos que tiene el BPA en organismos adultos son reversibles cuando cesa la exposición (Richter *et al.*, 2007), 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 a la etapa postnatal y/o in útero), afectan el crecimiento y la salud reproductiva de los seres vivos (Nava *et al.*, 2008).

Se ha observado, en diferentes cepas de ratas, que la exposición durante el periodo perinatal/neonatal produce en los organismos efectos organizacionales, que son debidos a la exposición del órgano durante el desarrollo y que continúan durante la pubertad y que resultan en una alteración persistente del sistema afectado (Richter *et al.* 2007). Es por ello que la mayor preocupación respecto a la exposición al BPA es durante el desarrollo, es decir, de fetos, neonatos, infantes, niños y adolescentes.

Se han realizado una gran cantidad de estudios en animales de laboratorio expuestos a las dosis a las que 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. La exposición de fetos de roedor a dosis bajas de BPA de 20 a 400 µg/kg/día produce efectos estrogénicos postnatales. En machos, la producción diaria de espermatozoides se reduce y aumenta el peso de la próstata, y en la hembra, el desarrollo del tejido reproductivo se ve modificado, se modifica la diferenciación sexual del cerebro, se presentan cambios en los niveles de la hormona luteinizante en suero, se presenta apertura vaginal temprana, alteraciones en el ciclo estral, cambios a largo plazo en la vagina, útero, ovario y glándula mamaria, y el crecimiento y la pubertad se aceleran (Honma *et al.*, 2002; Howdeshell *et al.*, 1999; Markey *et al.*, 2001 y 2003; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011; Nagel *et al.*, 1997; Rubin *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2006; Schönfelder *et al.*, 2002 y 2004; Vom Saal *et al.*, 1998; Welshons *et al.*, 2006).

En el ovario, se ha observado que el BPA es capaz de interferir en la esteroidogénesis ovárica, en la foliculogénesis y en la morfología ovárica, por lo cual se ha concluido que el ovario es un órgano blanco particularmente sensible al BPA (Markey *et al.*, 2003; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011; Newbold *et al.*, 2007; Schönfelder *et al.*, 2002). Animales tratados neonatalmente con BPA presentan una gran cantidad de quistes, por lo cual ha sido relacionado con el ovario poliquístico (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2010). El mecanismo por medio del cual el BPA impacta la función ovárica parece ser bidireccional. Específicamente, estudios *in vitro* han demostrado que la exposición de las células intersticiales de la teca del ovario de rata a BPA induce una elevada síntesis de testosterona (Zhou *et al.*, 2008). Los andrógenos interfieren en el procesamiento del BPA en el hígado, llevando a un aumento en los niveles de BPA en suero (Takeuchi *et al.*, 2006). El BPA, además, altera el metabolismo de los andrógenos en el hígado y se une fuertemente a la globulina que une hormonas sexuales (SHBG), desplazando a los andrógenos, lo que resulta en un incremento en los niveles de andrógenos libres en suero (Hanioka *et al.*, 1998).

En el cerebro, se ha reportado que la exposición fetal/neonatal a dosis bajas de BPA produce cambios en las áreas sexualmente dimórficas del cerebro, así como en la química y en la conducta. El BPA, por lo tanto, parece interferir con los procesos normales que gobiernan la diferenciación sexual del cerebro, presentando cambios tanto en machos como en hembras (Fujimoto *et al.*, 2006; Palanza *et al.*, 2008; Rubin *et al.*, 2006).

En el útero, hay estudios que demuestran que la muerte celular del epitelio uterino se ve alterada en la progenie de las ratas tratadas con BPA (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011), lo que indica que ocurrió un cambio importante en la programación de la diferenciación celular del tracto reproductivo lo cual a su vez llevó a una alteración significativa de la muerte celular. 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), 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 ha observado en ratas tratadas neonatalmente con BPA, una disminución en la capacidad reproductiva de los animales debido a un decremento en el número de crías y un decremento en la fecundidad y fertilidad a lo largo del tiempo (Cabaton *et al.*, 2011). Se ha demostrado que dosis de 200 y 300 mg de BPA/kg de peso corporal al día en los días 1 a 4 de gestación reducen los niveles de progesterona, así como disminuyen el número de sitios de implantación y aumentan el área luminal y la altura de las células epiteliales al día 6 de la gestación (Berger *et al.*, 2008). Así mismo, se ha observado que al administrar de forma subcutánea 10 mg de BPA/kg de peso corporal al día, del día 1 al 8 de gestación a ratones, se presenta una disminución en el número de crías (Tachibana *et al.*, 2007).

En un estudio realizado por Xiao *et al.* (2011), se trató de forma subcutánea a ratones hembra con 0.5, 10, 40 y 100 mg de BPA/ kg de peso corporal al día, del día 0.5 al 3.5 de gestación. Se observó una implantación tardía y un aumento en la mortandad perinatal con la dosis de 40 mg de BPA/kg de peso corporal al día. La

evidencia de la sugerida implantación tardía radica en la presencia de sitios de implantación más pequeños y menos vascularizados, así como una intensa expresión de los receptores a progesterona posterior al día de la implantación teórica y un epitelio luminal delgado sin zona decidual al día 4.5 de gestación. De igual forma, se observó un periodo de gestación más largo comparado con el control, así como camadas más pequeñas y supervivencia perinatal menor. Para la dosis de 100 mg de BPA/kg de peso corporal al día, no se observaron sitios de implantación al día 4.5 de gestación pero sí se observaron embriones retenidos en el oviducto y desarrollo tardío de embriones al día 3.5 de gestación 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 día 4.5 de gestación, lo que sugiere que además de afectar estos factores, el bisfenol altera la receptividad del útero hacia el blastocisto.

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 peso corporal 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 proliferación endotelial y en la expresión de mRNA del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) con ambas dosis (aunque no hubo un 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. La expresión de VEGF, a nivel transcripcional, aumenta en el epitelio luminal debido a los estrógenos, como el estradiol, y en el estroma debido a la progesterona, 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 hormono-dependientes.

Se realizó un estudio en el que se expuso neonatalmente a ratones a 0.25 ng, 250 ng y 25 µg de BPA/kg de peso corporal al día, del día 8 de gestación 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 del IDA y el NOAEL del BPA (Cabaton *et al.*, 2011).

Con respecto a los mecanismos moleculares que son afectados por el BPA, existen pocos estudios. Se sabe que cambios epigenéticos son capaces de tener efectos transgeneracionales (Manikkam *et al.*, 2013). En concordancia con esto, se han observado cambios en el patrón de metilación del promotor del gen HOXA10 (Pistek *et al.*, 2013), que da lugar a cambios en el patrón de expresión de este gen en el útero de ratas tratadas neonatalmente con BPA. Este gen regula la expresión de los genes integrina β3 y EMX-2 que están involucrados en procesos de implantación (Varayoud *et al.*, 2011).

En este estudio, ratas recién nacidas fueron tratadas de forma subcutánea con 0.05 mg y 20 mg de BPA/kg de peso corporal al día, en los días postnatales 1, 3, 5 y 7. Se encontró una menor expresión del gen HOXA10 al día 5 de gestación en las ratas tratadas con ambas dosis. El gen HOXA10 está involucrado en la preparación del útero para la implantación y su expresión está regulada por estradiol y progesterona. No se encontraron diferencias en los niveles séricos de estradiol ni progesterona al día 5 de gestación, pero sí en los receptores uterinos, cuya cantidad fue menor 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 disminuyó con ambas dosis, siendo estadísticamente significativo con la dosis alta únicamente. 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).

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 cambiar diversas circunstancias, por lo que más estudios relacionados con este disruptor permitirían elucidar un poco más sus mecanismos de acción.

3.4 Uniones estrechas y su relación con la implantación

Los eventos que llevan a la implantación del blastocisto de la rata ocurren durante los primeros 6 días de la gestación. El día uno se define como el día en que se lleva a cabo el apareamiento, y se considera representativo del día del estro. El día tres representa el periodo de pre-implantación. Durante el día 5, el blastocisto se acerca a la pared uterina (aposición del blastocisto). 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 (Murphy, 1993).

La implantación exitosa del blastocisto durante las primeras etapas del embarazo involucra una serie de cambios, regulados por hormonas, en las células del epitelio uterino que las hacen receptivas a la adhesión de las células del trofoblasto. Estos cambios implican una reorganización de la membrana plasmática y del citoesqueleto de las células epiteliales y este proceso es llamado “transformación de la membrana plasmática” (Murphy *et al.*, 1994; Murphy, 2000). Esta transformación de la membrana plasmática involucra cambios en la altura de las células epiteliales uterinas, en la longitud y la forma de los microvilli, en la expresión de marcadores de superficie celular, en la composición lipídica de la membrana plasmática, en el citoesqueleto y las proteínas que lo componen, etc. (Murphy, 1993). 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, están involucradas en la transformación de la membrana plasmática (Murphy, 2000).

Las uniones estrechas o “tight junctions” (TJ) en inglés, son redes proteínicas 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 de la 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 diferentes proteínas, 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. La ocludina y las claudinas son proteínas integrales de las TJ y están involucradas en la determinación de la permeabilidad epitelial y constituyen los filamentos de las TJ que se observan por criofractura (Tsukita *et al.*, 2001). 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. Las claudinas, por otra parte, son una familia de proteínas que incluye a más de 20 miembros codificados por genes independientes (Tsukita *et al.*, 2001) que contribuyen a las propiedades de adhesión y barrera de las uniones estrechas (Kubota *et al.*, 1999) y se ha sugerido que la coexpresión de distintas claudinas y su interacción pueden determinar la función particular de las uniones estrechas en distintos tejidos. 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). Entre las proteínas submembranales de las TJ, ZO-1 es la que mejor ha sido estudiada. Esta proteína se considera como una proteína de andamiaje que trae a proximidad cercana a diversas proteínas de las TJ (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2000). Los complejos de las proteínas ZO (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) unen las fibras de las uniones estrechas con el

citoesqueleto de actina (Fanning *et al.*, 1998; Wittchen *et al.*, 1999), por lo que se concentran en el lado citoplasmático de las uniones estrechas (Itoh *et al.*, 1993).

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).

Estudios previos de criofractura han demostrado que la complejidad geométrica de las TJ del epitelio luminal uterino se incrementa con el tratamiento con progesterona, hormona sumamente influyente en el endometrio uterino en los primeros días de la gestación. Se demostró que altos niveles de estrógenos, como los que hay en el proestro y en el día 1 de gestación, resultan en una unión estrecha con pocas interconexiones, lo que es congruente con el edema estromal que se observa en este tiempo. Sin embargo al día 5 de gestación, que es el momento de la implantación, la unión estrecha incrementa tres veces su profundidad a lo largo de la membrana plasmática lateral (Murphy *et al.*, 1982, 1993 & 2000). La estimulación con estrógenos resulta en una unión estrecha de fibras paralelas y una estimulación con progesterona causa que la red proteínica 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. Al observar las proteínas de las uniones estrechas durante el ciclo estral de la rata, se encontró que había una mayor cantidad en el proestro y en el estro, que es cuando los niveles de estrógenos y progesterona están en su máximo (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2005). 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.*, 1981, 1982). Por lo tanto, la función de las TJ en este epitelio parece estar involucrado en controlar el volumen y la composición del fluido luminal al momento en el que el blastocisto se está desarrollando y adhiriendo (Murphy *et al.*, 1982; Nicholson *et al.*, 2010).

Existen estudios que demuestran que la ocludina no se observa en los primeros días de gestación, sino que aparece con una señal apical en el día 6 de gestación, que es el momento en el que se lleva a cabo la implantación. ZO-1 y Claudina-1 se observan desde el día 1 de gestación, así como en los días 3, 6 y 7, sin embargo la señal de ZO-1 es principalmente apical, mientras que la de Claudina-1 es, además de apical e intensa, difusa en el citoplasma de las células epiteliales uterinas (Orchard *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2010).

Un estudio observó que al día 6 de gestación, ZO-1 se expresa en el lado apical del epitelio luminal y se observa también en la zona decidual primaria. Se concluyó que no es el proceso de decidualización el que induce la expresión de ZO-1, sino la cercanía o el contacto de las células deciduales con el trofoblasto. ZO-1 se expresa tanto en las células trofoblásticas como en las del epitelio luminal uterino antes de la implantación y en las células deciduales de la zona decidual primaria después de la implantación (Paria *et al.*, 1999).

En un experimento, se estudió la expresión de Claudina-1 y 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 progesterona y el cuarto de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos y progesterona. Se observó que en los cuatro grupos y en ambos días de gestación evaluados en las ratas preñadas, la proteína Claudina-1 se encontraba en el citoplasma basal de las células epiteliales lumbinales. 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 la cantidad de progesterona (Nicholson *et al.*, 2010).

Además de las funciones ya mencionadas, las proteínas ocludina, Claudina-1, ZO-1 y ZO-2 de las TJ se expresan 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, al embrión (Wang *et al.*, 2004) y ya que el éxito de un embarazo normal depende de la protección y el crecimiento del embrión dentro del micro-ambiente uterino, estas proteínas son de suma importancia.

A pesar de que se conoce como es la expresión de algunas de las proteínas de las TJ en el útero de la rata durante los primeros días de la gestación, aún no existen datos que demuestren si la expresión y la localización de estas proteínas se ven modificadas por el BPA.

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 en las tasas de embarazo, ya que estos compuestos exógenos al organismo tienen la capacidad de mimetizar la acción de hormonas naturales y alterar la homeostasis de los sistemas endócrino y reproductivo.

Un disruptor endócrino al cual estamos actualmente expuestos, debido a su presencia en empaques alimenticios, 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. Sin embargo, pocos estudios se han especializado en los mecanismos a nivel molecular por los cuales actúa el BPA, por lo que el presente proyecto, además de observar los efectos del BPA sobre algunos parámetros reproductivos, se enfocará en la posible alteración de tres proteínas presentes en las uniones estrechas del epitelio uterino que están relacionadas con el proceso de implantación en la rata.

5. Hipótesis

Debido a los efectos conocidos del disruptor endócrino bisfenol-A sobre la homeostasis del sistema endócrino y reproductivo, se espera observar alteraciones en los parámetros reproductivos (menor índice de fecundación, menor tasa de implantación, menor número de embriones y mayor número de sitios de reabsorción) y en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas relacionadas con la funcionalidad del epitelio endometrial y un decremento en las tasas de implantación en los animales tratados.

6. Objetivo general

Estudiar el efecto que tienen diferentes dosis del disruptor endócrino bisfenol-A sobre la ovulación, fertilización, implantación y los mecanismos moleculares (proteínas de uniones estrechas) que podrían estar involucrados en el control de la implantación en la rata.

6.1 Objetivos particulares

Evaluar el efecto de diferentes dosis de BPA en ratas gestantes sobre:

- A) El tiempo de gestación y número de crías.
- B) La ganancia de peso de las crías de la generación F1 durante cinco semanas después de su nacimiento.
- C) La distancia anogenital de la generación F1.
- D) La concentración de BPA en suero de los machos de la generación F1 al día del destete.
- E) El índice de fecundación de la generación F1.
- F) Las tasas de ovulación de la generación.
- G) Las tasas de implantación de la generación F1.
- H) El número de embriones y sitios de reabsorción de la generación F1.
- I) La expresión en la generación F1 de las proteínas de las uniones estrechas (ZO-1, ocludina y claudina-1) en el epitelio luminal durante la gestación temprana.

7. Metodología

7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron animales del Bioterio Harlan de México bajo estrictos controles de periodos luz:oscuridad 12h:12h, con agua y comida ad libitum. Este estudio fue aprobado por el comité de ética (CICUAL) de la Facultad de Química. Se determinó diariamente la etapa del ciclo de 48 hembras Wistar durante los meses de Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre (2013) con el fin de obtener a 21 hembras aptas para el experimento. Una vez seleccionadas, se utilizaron 15 machos, también Wistar, para las montas.

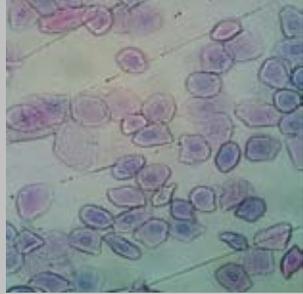
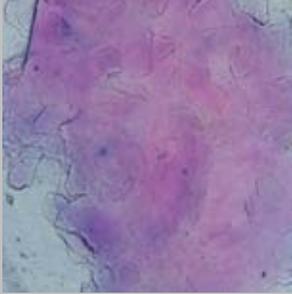
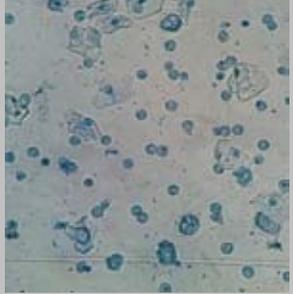
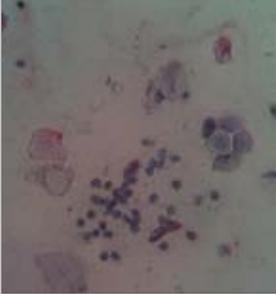
7.2 Monitoreo del ciclo estral y apareamiento

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

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

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

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

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

Después de seleccionar a las 21 ratas con ciclos regulares, se procedió a controlar su apareamiento. Con base en el monitoreo, se observó el día en el que la hembra era receptiva al macho y se colocó a este último en la jaula de la hembra a las seis de la tarde y se removió a las once de la mañana del día siguiente. Inmediatamente después de remover al macho, se le tomó frotis vaginal a la hembra con el fin de verificar la gestación. El frotis teñido de la hembra preñada debería mostrar espermatozoides el día posterior a la monta (Figura 2) para que este día fuera considerado como el día 1 de gestación.

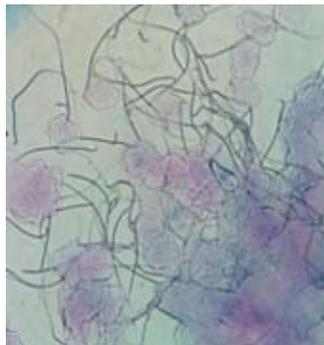


Figura 2. Frotis vaginal teñido de una rata hembra en su primer día de gestación.

7.3 Tratamiento farmacológico de la generación F0

Una vez verificada la gestación de la rata, se pesó y se clasificó en alguno de los tres grupos, ya sea control, dosis baja de BPA (0.05 mg/kg de peso corporal al día) o dosis alta (20 mg/kg de peso corporal al día). En la preparación de los tratamientos de los grupos de dosis baja y dosis alta, se consideró el peso de cada rata para ajustar la dosis. De acuerdo con las estimaciones de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) la dosis menor de efectos adversos observada (LOAEL) para la exposición oral a BPA en ratas es 50 mg/kg/día. Expertos del Programa Nacional Toxicológico (NTP) sugirieron una dosis de corte de 5 mg BPA/kg/día para la clasificación de efectos a dosis bajas, sin importar la vía de administración, duración de la exposición o la etapa/edad de la vida en la cual ocurre esta exposición (Melnick *et al.*, 2002). Por lo tanto, la dosis alta seleccionada en el presente proyecto es cuatro veces mayor a la dosis de corte baja sugerida por los expertos de la NTP y 2.5 veces menor que el LOAEL de U.S. EPA. La dosis baja es 100 veces menor a la dosis de corte baja sugerida por los expertos de la NTP y corresponde a la IDA de BPA.

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

Se pesó en balanza analítica la cantidad indicada de BPA y se disolvió en etanol absoluto utilizando un tubo eppendorf y un vortex. Esta disolución se agregó al 0.1% al agua de bebida de los animales. Esta agua se suministró en botella de vidrio para evitar que compuestos provenientes de botellas de plástico que contengan policarbonato interfieran en los resultados. Se decidió suministrar de esta forma el compuesto ya que por medio de la ingesta es la principal forma de exposición de los humanos a este compuesto. De esta forma, el grupo control solamente ingirió agua destilada con etanol al 0.1%. Las hembras preñadas recibieron el tratamiento a partir del día 6 de gestación y hasta el día postnatal 21.

Se verificó el volumen ingerido diariamente de agua de bebida durante el tratamiento con el fin de asegurar que las ratas recibían la dosis correspondiente al grupo en el cual fueron clasificadas. Nuevamente, se obtuvo un promedio de 30 mL de agua consumidos diario con una ligera tendencia a aumentar durante la gestación.

7.4 Caracterización fenotípica de la generación F1

El día del destete, es decir, el día postnatal 21, se sexaron las crías y se separaron machos de hembras. Se obtuvo, con balanza electrónica, el peso en gramos de cada cría y, con vernier, su distancia anogenital. Esta distancia, medida en mm, se dividió entre la raíz cúbica del peso en gramos, también al día del destete, antes de realizar las pruebas estadísticas. A las crías hembras se les marcó y se les colocó agua libre de BPA y comida ad libitum. Los machos fueron sacrificados por decapitación ese mismo día con el fin de obtener su sangre para determinar la concentración de BPA en suero.

7.5 Cuantificación de BPA en suero

Una vez obtenida la sangre de los machos, se procedió a centrifugarla durante diez minutos a 2500 rpm. Después de ser centrifugada, se observó la separación del suero, que fue recolectado en tubos eppendorf utilizando una pipeta pasteur con bulbo. Los tubos se almacenaron en un congelador Revco con el fin de mantener el suero en buenas condiciones hasta estar listas las muestras de las 21 camadas.

Obtenidas ya las muestras de suero de las 21 camadas, se evaluaron por el método inmunométrico "ELISA" (Abraxis LLC, PA, USA), previamente usado en diferentes estudios (Takeuchi *et al.*, 2004; Kandaraki *et al.*, 2011), los niveles de BPA presentes en el suero de las crías de las madres tratadas y se compararon con los de las crías de las madres control. Para ello, se mezclaron 50 μ L de una muestra y 50 de otra de un macho del mismo tratamiento y se agregaron 10 μ L de β -glucuronidasa de *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich, G7017 ≥ 100000 U/mL) y 200 μ L de buffer de ácido acético para luego incubar la mezcla 24 horas a 37°C. Se

acondicionaron columnas con 10 mL de metanol absoluto y posteriormente 6 mL de agua destilada. Una vez acondicionada la columna, se hizo pasar la muestra incubada y se lavó con 6 mL de metanol al 35 % para finalmente eluir la muestra con 2.5 mL de metanol absoluto. En la prueba de ELISA, el BPA es reconocido por un anticuerpo monoclonal con un alto nivel de sensibilidad y un rango de detección de 0.05 µg/L a 10 µg/L (ppb) y un coeficiente de variación menor al 10%. La reacción de ELISA fue leída en un lector de microplacas a 450 nm.

Una vez verificado que las crías recibieron el compuesto a través de sus madres, las hembras se dejaron llegar a edad adulta (tres meses de edad) para posteriormente monitorear su ciclo estral por frotis vaginal y aparearlas, verificando la gestación por la presencia de espermatozoides el día posterior al apareamiento.

7.6 Evaluación de parámetros reproductivos de la generación F1

Una vez apareadas las hembras de la generación F1 se cuantificó el número de hembras fecundadas y el número total de hembras apareadas para obtener el índice de fecundación con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de fecundación} = \frac{\text{Número de hembras fecundadas}}{\text{Número total de hembras apareadas}} \times 100$$

Además, se sacrificaron, por decapitación, 5 hembras de cada tratamiento a los días 1, 3, 6, 7 y 18 de gestación. Las ratas fueron anestesiadas antes del sacrificio. De acuerdo con el día de gestación al que era sacrificada la hembra preñada, se determinó un parámetro reproductivo particular.

Al día 1 de gestación, se cuantificó el número de óvulos presentes en ambos oviductos para obtener la tasa de ovulación. Tras el sacrificio, se extrajeron ambos oviductos y se localizaron y cuantificaron los óvulos con un microscopio estereoscópico sobre un portaobjetos con fondo negro.

Al día 6 y al día 7 de gestación, las hembras fueron inyectadas 350 μ L de una solución al 0.5 % de azul de Evans en solución salina fisiológica (NaCl 0.15 M) treinta minutos antes del sacrificio, de manera que al observar el útero, los sitios de implantación se teñían con el colorante y eran fácilmente identificables. De esta manera se obtuvieron las tasas de implantación.

Al día 18 de gestación, se cuantificó por inspección visual del útero el número de embriones y el número de sitios de reabsorción, que se definen como los sitios endometriales con una masa amorfa adherida sin feto.

7.7 Procesamiento de los tejidos

Para las hembras sacrificadas a los días 1, 3, 6 y 7 de gestación, además de evaluar los parámetros mencionados, se obtuvo una muestra de aproximadamente 5 mm del útero. En las hembras sacrificadas a los días 6 y 7 de gestación, se obtuvo una muestra tanto de sitios de implantación, como de sitios de no implantación. Las muestras fueron fijadas con una solución al 4 % de paraformaldehído en PBS (NaCl 0.137 M, KCl 0.00268 M, Na₂HPO₄ 0.01014 M, KH₂PO₄ 0.00176 M; pH 7.4) durante 2 horas y posteriormente se lavaron con una solución de PBS en la que permanecieron hasta su posterior tratamiento.

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

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

impregnada con etanol 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.

7.8 Estudio de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas

Para realizar los ensayos de inmunohistoquímica de fluorescencia, se desparafinaron las muestras de tejido 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 para permeabilizarlos. Nuevamente se les dieron dos lavados de 5 minutos con PBS y se les trató por media hora con albúmina al 5% en PBS para bloquear uniones inespecíficas. Transcurrida la media hora, se agregó el anticuerpo primario de acuerdo con su preparación: Rabbit anti-ZO-1/61-7300 de Zymed a 0.25 mg/mL (utilizado a una dilución 1:100), Rabbit anti-Claudin-1/51-9000 de Invitrogen a 0.25 mg/mL (utilizado a 10 µg/mL), Rabbit anti-Occludin/71-1500 de Invitrogen a 0.25 mg/mL (utilizado a 20 µg/mL) en Tritón x-100 al 3% en PBS y se dejó incubar en refrigeración toda la noche. Al día siguiente, se les dieron a los tejidos otros dos lavados de 5 minutos con PBS y se agregó el anticuerpo secundario Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG/711-025-152 de Jackson Immuno Research Laboratories Inc. a 1.5 mg/mL en una dilución de 1:100 con PBS y se dejó incubar durante 2 horas teniendo cuidado de no exponer los portaobjetos a la luz para preservar la señal del fluoróforo. Por último, se realizaron otros dos lavados de 5 minutos con PBS y se montaron las muestras agregando medio de montaje para fluorescencia adicionado con DAPI para teñir los núcleos celulares y sellando con barniz. Para los controles negativos, se omitió el anticuerpo primario. La fluorescencia se examinó y se capturó la imagen con un microscopio confocal (Olympus FV1000).

7.9 Análisis de los datos

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

Para el número de crías F1 al día del nacimiento y al día del destete, los días de gestación a los cuales nacieron, la distancia anogenital de las crías F1, el aumento de peso de las crías F1, las tasas de ovulación e implantación de las ratas F1 y el número de embriones y sitios de reabsorción de las crías F1 al día 18 de gestación, se realizó un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey con el fin de conocer si existía diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos.

8. Resultados

8.1 Características de gestación y 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 para cualquiera de los dos resultados, como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Días de gestación y número de crías. V.S.: contra. D.E.: desviación estándar.

Tratamiento	Días de gestación (Promedio \pm D.E.)	Diferencia significativa (V.S. Control)	Número de crías al nacimiento (Promedio \pm D.E.)	Diferencia significativa (V.S. Control)	Número de crías al destete (Promedio \pm D.E.)	Diferencia significativa (V.S. Control)
Control	23 \pm 0	-	9.8 \pm 2.48	-	9 \pm 2.82	-
Dosis Baja	23.33 \pm 0.54	No	10.8 \pm 1.67	No	9.8 \pm 1.48	No
Dosis Alta	23.2 \pm 0.40	No	10.8 \pm 2.04	No	9 \pm 1	No

Se puede observar que casi todas las camadas nacieron al día 23 de gestación (con unas pocas naciendo al día 24) y que van desde 8 hasta 14 crías por camada para los tres tratamientos. Se realizó un análisis estadístico que mostró que no existe suficiente evidencia para asegurar que hay diferencia significativa entre las medias del número de crías nacidas vivas ni los días de gestación a los cuales nacieron de los tres grupos.

Se observó que, en aproximadamente la mitad de los casos, existió en el día del destete una disminución en el número de crías con respecto al número inicial. Esta disminución fue desde una cría hasta cinco, con un promedio de dos crías, y se puede deber a desnutrición, defectos prenatales, etc., sin embargo tampoco se encontró diferencia significativa entre tratamientos en este parámetro.

8.2 DAG al día del destete de la generación F1

En la figura 3 se muestra la gráfica correspondiente al análisis estadístico comparativo entre los distintos tratamientos con respecto a la relación entre la distancia anogenital y el peso al día del destete para los machos. Se muestra, como barra de color negro en la parte superior de los datos de cada tratamiento, el error de cada grupo. Para obtener esta gráfica se dividió la distancia anogenital de cada cría en mm entre la raíz cúbica de su peso. Mediante un análisis de t-student se observó que hay una diferencia significativa entre la media del grupo control y la media del grupo de dosis baja de bisfenol-A. De igual manera, otro análisis de t-student permitió observar que también existe diferencia significativa entre la media del grupo control y la media del grupo de dosis alta de bisfenol-A. Estos resultados indican un posible efecto del compuesto sobre los mecanismos que regulan, en etapas tempranas, el desarrollo de los órganos sexuales, debido a que se observa que la distancia anogenital de los machos, al día postnatal 21, tiende a aumentar con el aumento de la dosis.

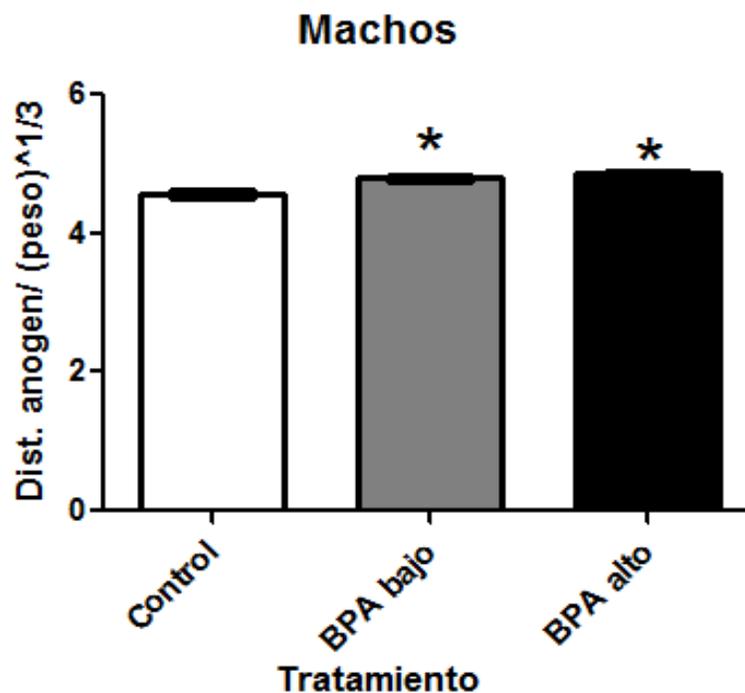


Figura 3. Análisis comparativo de la relación $D.A.G./\sqrt[3]{\text{peso}}$ para machos al día del destete.* $p < 0.05$ vs control.

Se llevó a cabo el mismo análisis para las hembras, sin embargo, a pesar de que se observa que la DAG tiende a disminuir con el aumento de la dosis, en este caso no se encontró suficiente evidencia para asegurar que existe una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos, de lo que se deduce que las hembras podrían ser menos susceptibles a los efectos del BPA que los machos en cuanto al desarrollo de los órganos reproductivos. Los resultados se muestran en la figura 4.

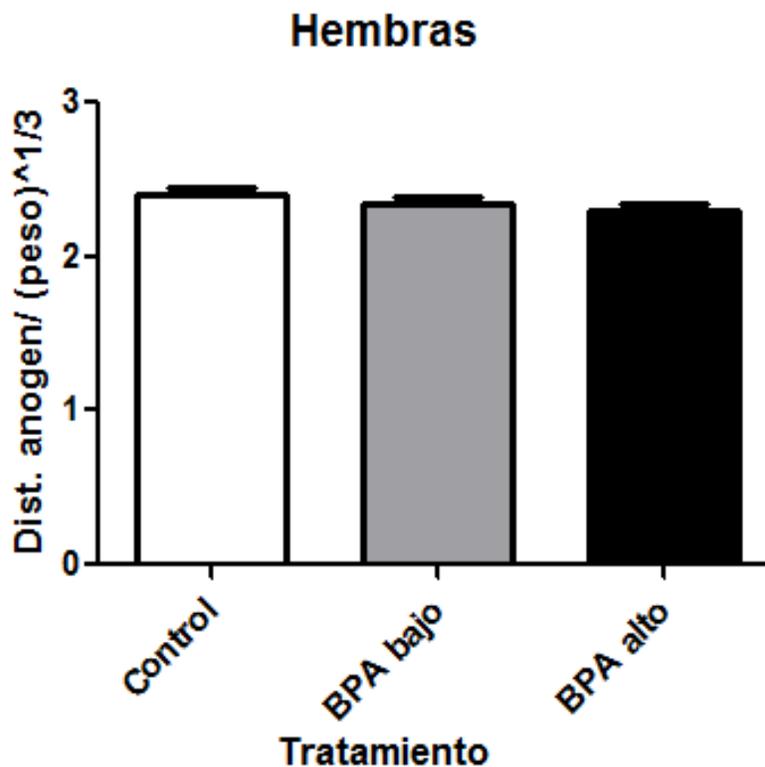


Figura 4. Análisis comparativo de la relación $D.A.G./\sqrt[3]{\text{peso}}$ para hembras al día del destete.

8.3 Cambios en el peso corporal de la generación F1

Se pesaron las hembras el día del destete y se pesaron cuatro veces más (una vez por semana) con el fin de monitorear su incremento de peso y comparar las curvas de los distintos tratamientos del día postnatal 21 al 51. Se obtuvo el promedio de los cinco pesos para cada tratamiento. En la figura 5 se muestra la gráfica del análisis estadístico comparativo entre las curvas de crecimiento de las crías de cada tratamiento. El análisis de t-student realizado demostró que no

existe diferencia significativa entre las medias de los pesos de cada tratamiento en ninguno de los días postnatales evaluados. Se pesó a cada cría hembra de las camadas del grupo control, del grupo de dosis baja y del grupo de dosis alta, al día postnatal 21, 28, 35, 44 y 51 (Tabla 3).

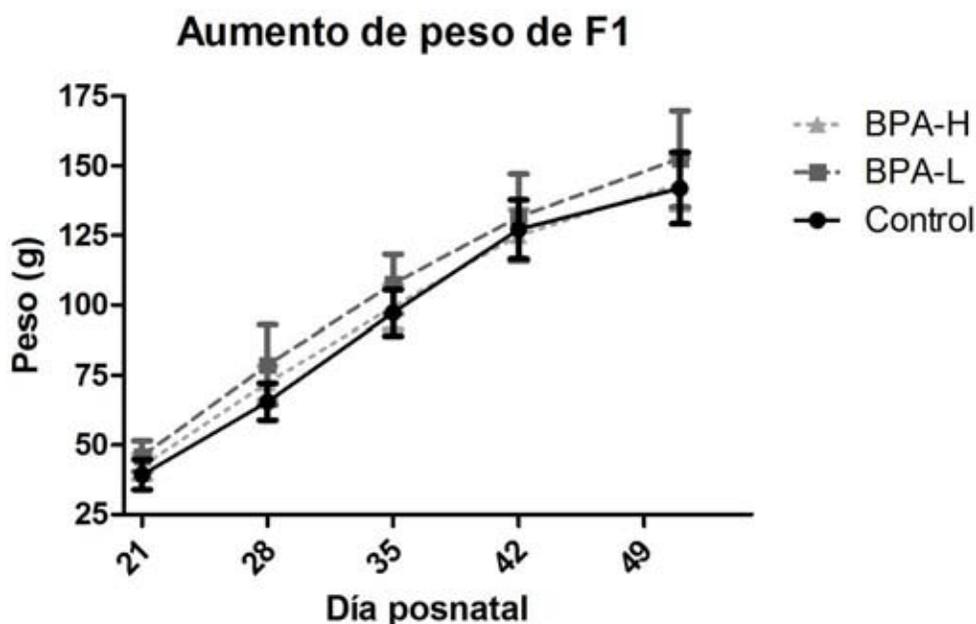


Figura 4. Gráfica comparativa del aumento de peso de las hembras F1.

Tabla 3. Pesos de los tres grupos a los días post-natales 21, 28, 35, 42 y 51.

Tratamiento	Peso (g) al día 21 (Promedio±D.E.)	Peso (g) al día 28 (Promedio±D.E.)	Peso (g) al día 35 (Promedio±D.E.)	Peso (g) al día 42 (Promedio±D.E.)	Peso (g) al día 51 (Promedio±D.E.)
Control	39.36±5.43	65.56±6.64	97.29±8.26	127.20±10.62	141.97±12.81
Dosis Baja	45.96±5.58	78.7±14.22	107.62±10.72	131.57±15.48	152.52±17.33
Dosis Alta	42.26±4.56	72.34±6.06	99.29±8.06	124.98±9.38	143.48±9.27

8.4 Niveles de BPA en suero de la generación F1

Tras leer la reacción final del kit de ELISA para detección de bisfenol-A con un lector de microplacas a 450 nm, se obtuvieron las concentraciones (en ng de BPA/mL de suero) del disruptor endócrino en las crías macho de las hembras que

ingirieron directamente el compuesto (Tabla 4). Esta prueba se realizó con el fin de comprobar que las hembras cuya fertilidad iba a ser evaluada habían sido expuestas al BPA durante su gestación y lactancia por medio de la leche materna. Cabe destacar que, a pesar de arrojar información cuantitativa, la extrapolación del estudio de los machos a las hembras supone una incertidumbre en la variación de los valores obtenidos para los machos con respecto a los reales de las hembras.

Tabla 4. Cuantificación de BPA en el suero de los machos de la generación F1 por ELISA

STD1	STD1	SPL3	SPL3	SPL11	SPL11	SPL19	SPL19	SPL27	SPL27	SPL35	SPL35	Well ID
1.2	1.198	0.162	0.15	0.112	0.114	0.194	0.205	0.104	0.087	0.086	0.081	450
100.096	99.904	13.495	12.536	9.325	9.525	16.164	17.132	8.691	7.273	7.156	6.789	B/B0x
0.001	0.002	5.426	7.064	>10.000	>10.000	3.249	2.822	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	Conc
STD2	STD2	SPL4	SPL4	SPL12	SPL12	SPL20	SPL20	SPL28	SPL28	SPL36	SPL36	Well ID
1.052	1.05	0.128	0.109	0.106	0.101	0.155	0.161	0.085	0.064	0.079	0.073	450
87.743	87.585	10.659	9.083	8.816	8.449	12.953	13.453	7.065	5.321	6.564	6.097	B/B0x
0.045	0.046	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	6.248	5.482	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	Conc
STD3	STD3	SPL5	SPL5	SPL13	SPL13	SPL21	SPL21	SPL29	SPL29	SPL37	SPL37	Well ID
0.631	0.668	0.1	0.083	0.115	0.109	0.119	0.122	0.075	0.081	0.082	0.127	450
52.596	55.732	8.324	6.906	9.608	9.091	9.934	10.209	6.247	6.764	6.798	10.601	B/B0x
0.303	0.264	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	Conc
STD4	STD4	SPL6	SPL6	SPL14	SPL14	SPL22	SPL22	SPL30	SPL30	SPL38	SPL38	Well ID
0.396	0.34	0.112	0.111	0.104	0.1	0.145	0.133	0.072	0.063	0.075	0.08	450
33.046	28.375	9.333	9.216	8.649	8.299	12.069	11.093	5.997	5.263	6.255	6.689	B/B0x
0.768	1.018	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	8.263	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	Conc
STD5	STD5	SPL7	SPL7	SPL15	SPL15	SPL23	SPL23	SPL31	SPL31	SPL39	SPL39	Well ID
0.154	0.111	0.138	0.138	0.085	0.081	0.172	0.161	0.074	0.079	0.075	0.082	450
12.861	9.25	11.535	11.51	7.098	6.781	14.313	13.453	6.164	6.622	6.264	6.848	B/B0x
6.412	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	4.517	5.482	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	Conc
BLK	BLK	SPL8	SPL8	SPL16	SPL16	SPL24	SPL24	SPL32	SPL32	SPL40	SPL40	Well ID
0.622	0.641	0.146	0.136	0.087	0.088	0.146	0.144	0.082	0.062	0.074	0.073	450
51.854	53.48	12.177	11.302	7.298	7.323	12.219	12.052	6.823	5.171	6.147	6.064	B/B0x
0.313	0.291	7.951	>10.000	>10.000	>10.000	7.837	8.313	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	Conc
SPL1	SPL1	SPL9	SPL9	SPL17	SPL17	SPL25	SPL25	SPL33	SPL33	SPL41	SPL41	Well ID
0.149	0.133	0.184	0.165	0.129	0.117	0.13	0.131	0.07	0.066	0.066	0.103	450
12.403	11.118	15.313	13.795	10.759	9.8	10.843	10.885	5.88	5.538	5.471	8.599	B/B0x
7.371	>10.000	3.736	5.054	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	Conc
SPL2	SPL2	SPL10	SPL10	SPL18	SPL18	SPL26	SPL26	SPL34	SPL34	STD3	STD4	Well ID
0.145	0.139	0.168	0.17	0.149	0.144	0.094	0.057	0.088	0.083	0.566	0.328	450
12.077	11.585	13.979	14.137	12.419	12.027	7.84	4.754	7.315	6.906	47.233	27.332	B/B0x
8.238	>10.000	4.85	4.686	7.331	8.39	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	0.383	1.092	Conc

Se pueden observar en amarillo los datos de la curva patrón con respecto a la cual se determinó la cantidad de BPA en el suero de las crías. Las casillas blancas corresponden a las crías del grupo control, mientras que las rosas al grupo de dosis baja y las verdes al grupo de dosis alta. Las casillas con letras rojas corresponden al blanco de reacción y las casillas con letras azules a repeticiones en la cuantificación de dos muestras. Se obtuvo una ecuación para la curva patrón tomando en cuenta la cantidad estandarizada de BPA y su absorbancia final con el fin de conocer la concentración de BPA en cada una de las muestras de suero.

Es posible notar que gran parte de las muestras exceden los 10.000 ng/mL de BPA, que es el límite superior cuantificable que permite leer el kit, sin embargo fue posible obtener la cantidad equivalente de BPA de algunas de las muestras que

superaban este valor, introduciendo su valor de absorbancia en la ecuación de la curva patrón. De esta manera, se obtuvieron los promedios de cada grupo con las muestras que pudieron leerse o introducirse en la ecuación. Para el grupo control, se obtuvo un promedio de 7.77 ng/mL de BPA en suero, tomando en cuenta 7 de las 10 muestras. Para el grupo de dosis baja, el promedio obtenido fue de 31.04 ng/mL, tomando en cuenta 10 de las 15 muestras. Para el grupo de dosis alta ninguna de las muestras fue cuantificable por este método, sin embargo se considera que los valores son superiores a los del grupo de dosis baja. Cabe aclarar que cada muestra cuantificada es la mezcla del suero de dos machos del mismo tratamiento y que cada una de estas se realizó por duplicado.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado, ya que se halló una mayor cantidad de BPA en el suero de las crías de las madres tratadas con el compuesto con respecto a las control. A su vez, se encontraron niveles más altos del disruptor en los machos del grupo de dosis alta con respecto a los del grupo de dosis baja. Sin embargo, puede notarse que el ensayo cuantificó valores considerables de BPA en el suero de las ratas control, por lo que se puede deducir que existió otra fuente de exposición al disruptor o que el método de cuantificación es inadecuado, ya que es posible que haya arrojado falsos positivos. Es recomendable cuantificar el BPA por medio de otro método como HPLC (High performance liquid chromatography) acoplado a espectrometría de masas para obtener valores más precisos.

8.5 Evaluación de parámetros reproductivos

8.5.1 Índice de fecundación

Tomando en cuenta el número de hembras apareadas y el número de hembras fecundadas, se obtuvo un índice de fecundación del 100 % para los grupos control y dosis baja (22 ratas apareadas y fecundadas), mientras que para el grupo de dosis alta, fue de 90.91% (22 ratas apareadas y 20 fecundadas), es decir, casi 10% menor que el de los otros dos grupos.

8.5.2 Tasas de ovulación

La figura 6 presenta una imagen de los óvulos recuperados de la trompa. Se cuantificó el número de óvulos en ambos oviductos de cada rata sacrificada el día 1 de gestación.

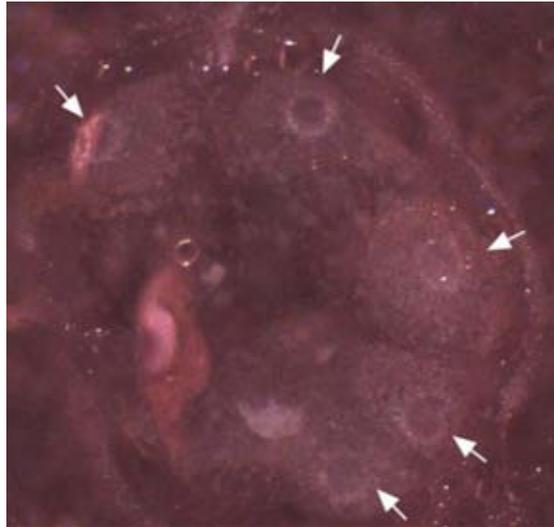


Figura 6. Óvulos recuperados de un oviducto de rata al día 1 de gestación.

Los resultados estadísticos para las tasas de ovulación de los tres tratamientos se muestran en la figura 7. No se observaron diferencias significativas en el número de óvulos recuperados entre los tres grupos de estudio.

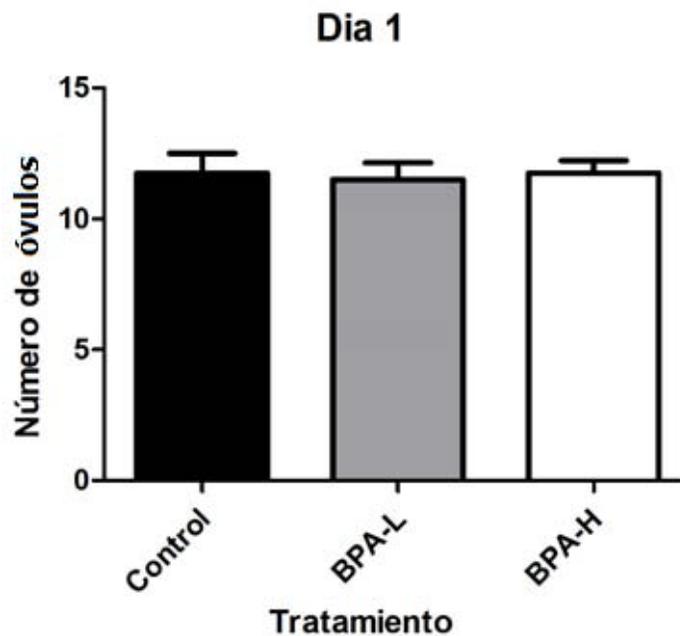


Figura 7. Número de óvulos al día 1 de gestación para las ratas de cada tratamiento.

8.5.3 Tasas de implantación

Se cuantificaron los sitios de implantación en ambos cuernos uterinos a los días 6 y 7 de gestación con ayuda de una inyección intravenosa de azul de Evans inyectada 30 minutos antes del sacrificio. En estos sitios aumenta la vascularización con respecto al resto del útero, ya que es esencial para un embarazo exitoso que el embrión reciba de manera adecuada todos los nutrimentos que necesita para desarrollarse. De esta manera, la vascularización incrementada en los sitios de implantación da como resultado que éstos se tiñan con el azul de Evans inyectado. En la figura 8 se observan los úteros extraídos de un animal control y uno tratado con dosis alta de BPA. Los sitios de implantación se muestran como secciones abultadas del útero teñidas de azul, por lo que es posible notar la diferencia en el número de sitios para cada tratamiento.

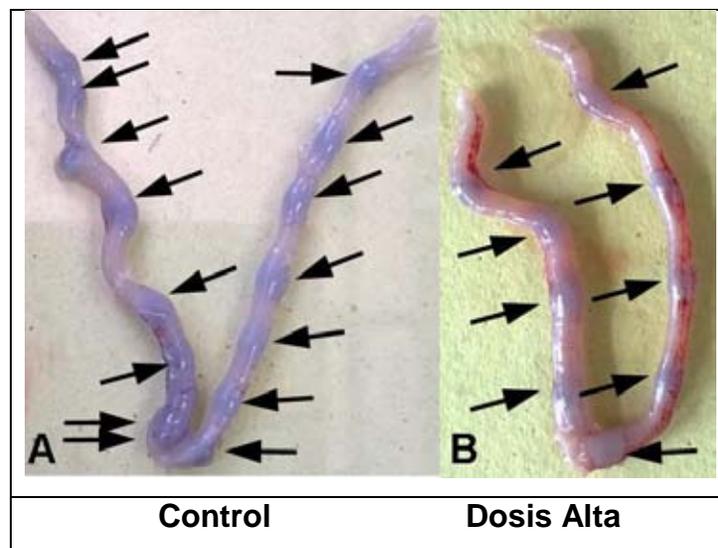


Figura 8. Sitios de implantación teñidos de rata control y rata tratada con dosis alta de BPA.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de las tasas de implantación de los tres tratamientos. Se encontró una diferencia estadística significativa en el número de sitios de implantación del grupo de dosis alta con respecto al control, siendo la tasa de implantación del grupo tratado menor. De igual forma se observa una disminución en el número de sitios de implantación del grupo de dosis baja con respecto al control, sin embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

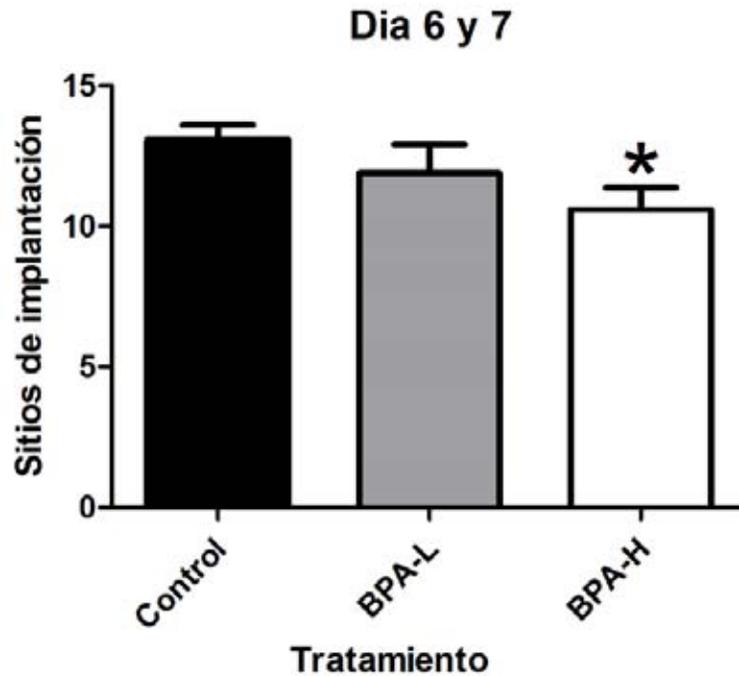


Figura 9. Tasas de implantación a los días 6 y 7 de gestación para los tres tratamientos. * $p < 0.05$ vs control

8.5.4 Número de embriones y sitios de reabsorción

Al día 18 de gestación, se inspeccionó visualmente el útero recuperado de las ratas con el fin de cuantificar los embriones y sitios de reabsorción de cada grupo (Figura 10).

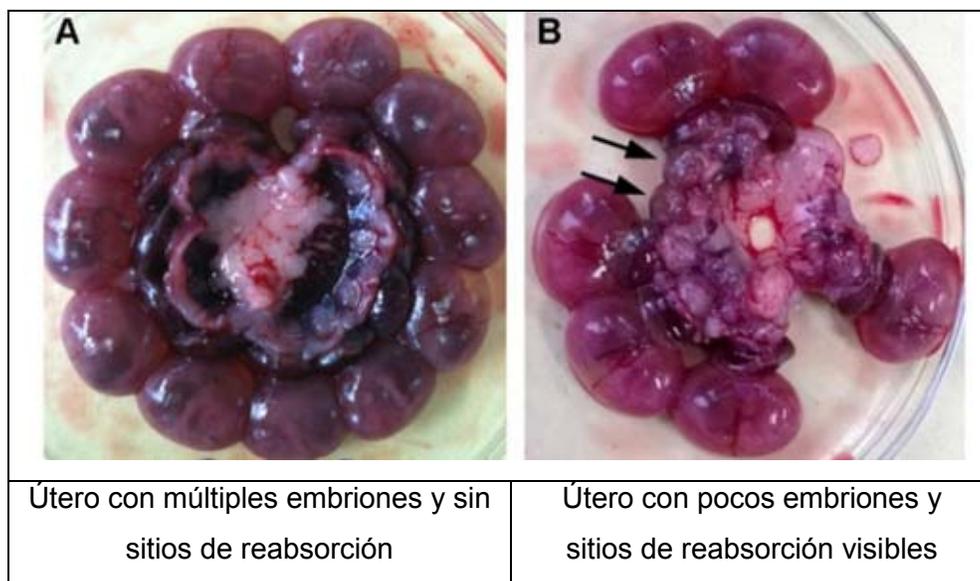


Figura 10. Comparación de úteros con distinto número de embriones y sitios de reabsorción.

Se pueden observar los resultados obtenidos en las figuras 11 y 12. No se encontraron diferencias estadísticas significativas en el número de embriones ni en el número de sitios de reabsorción entre los tres grupos.

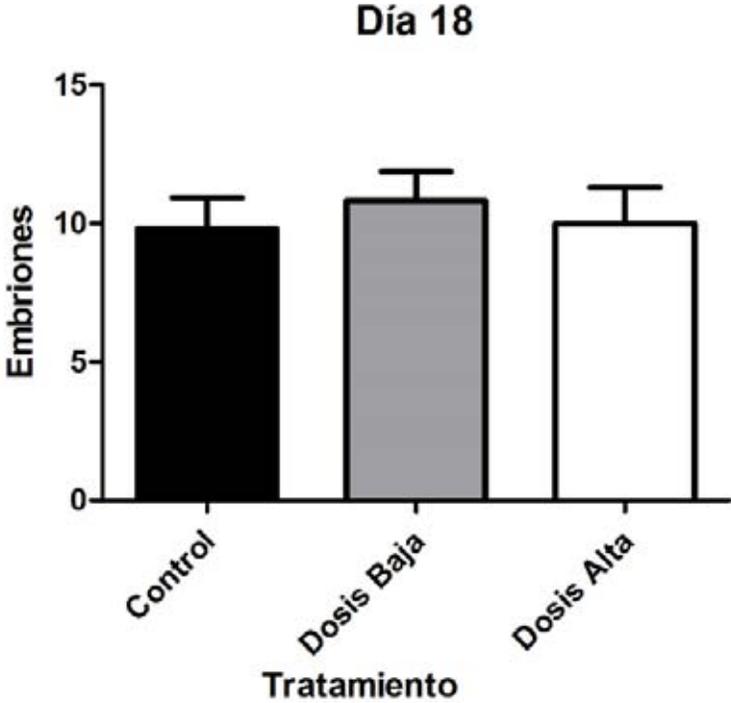


Figura 11. Número de embriones al día 18 de gestación para cada tratamiento.

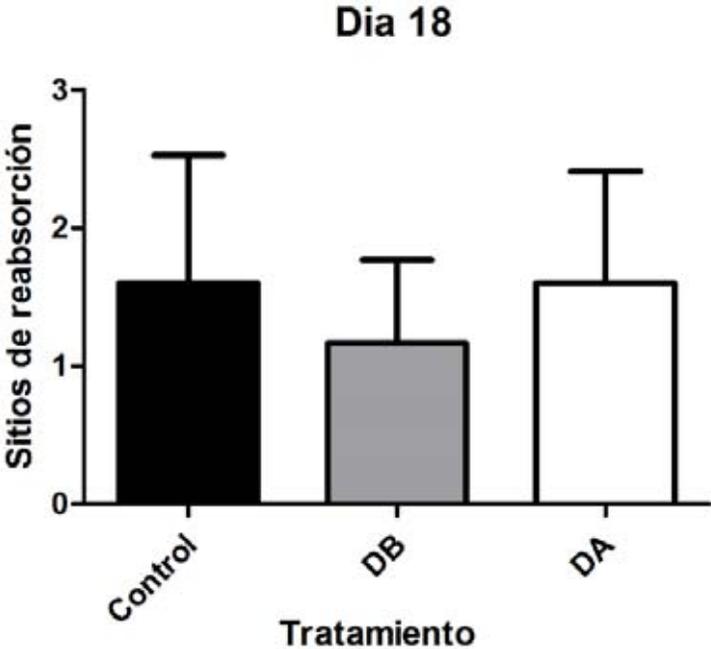


Figura 12. Número de sitios de reabsorción al día 18 de gestación para cada tratamiento.

8.6 Expresión de proteínas de uniones estrechas

8.6.1 Claudina-1

En las figuras 13 y 14 se muestran imágenes representativas de las pruebas inmunohistoquímicas realizadas a los úteros recuperados a los días 1, 3, 6 y 7 de gestación con el fin de observar la intensidad de señal y el patrón de distribución de la proteína Claudina-1 en los tres grupos. En los días 6 y 7 se observaron tanto los sitios de implantación como los de no implantación.

En el día 1 de gestación, se observó la inmunotinción de la proteína Claudina-1 a lo largo de la membrana plasmática lateral en los úteros de las ratas de los tres tratamientos. En el grupo tratado con la dosis baja (Fig. 13B), se observó un patrón de distribución similar al del control (Fig. 13A), con un ligero aumento en la tinción, sin embargo en el grupo tratado con la dosis alta (Fig. 13C), además de observar una tinción aún más intensa que la de la dosis baja, se observaron cambios en el patrón de expresión, ya que además de la expresión apical y lateral de la proteína, ésta se presentó en la región basal de las células epiteliales.

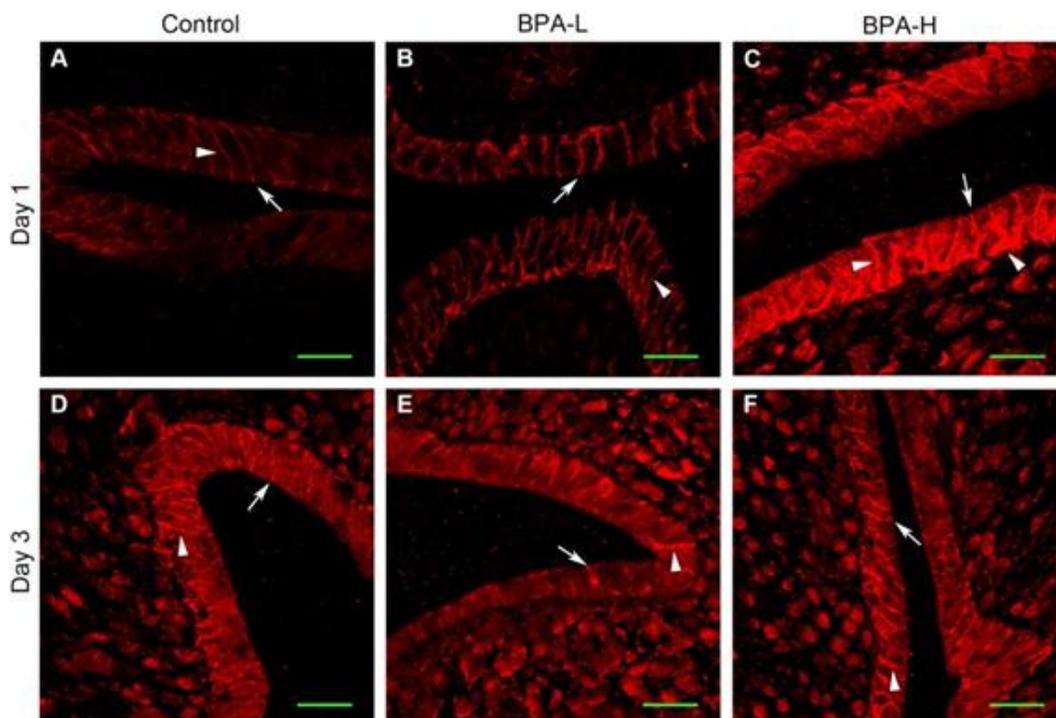


Figura 13. Expresión de Claudina-1 en útero de rata a los días 1 y 3 de gestación. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. Barra de escala: 20 μ m.

Con respecto al día 3 de gestación de los animales control (Fig. 13D), la proteína se encontró tanto en la zona apical y lateral de la membrana plasmática, como en el citoplasma, mientras que para las ratas tratadas con la dosis baja (Fig. 13E), la Claudina-1 solamente se observó en la zona lateral de la membrana y en el citoplasma, ya que la señal apical disminuyó considerablemente. De manera contrastante, el grupo tratado con dosis alta (Fig. 13F) presentó una sobreexpresión de la proteína en las zonas apical y lateral de la membrana plasmática, mientras que su señal citoplasmática coincidió en intensidad con la del grupo control.

Al día 6 de gestación se observó en las ratas control que la señal de la Claudina-1 había disminuido en la zona apical en los sitios de implantación (Fig. 14A) y que su expresión era más notable en la mitad inferior de la membrana plasmática lateral. De igual manera se observó expresión citoplasmática ligeramente menos intensa que la observada al día 3. Las ratas tratadas con la dosis baja (Fig. 14B) mostraron un patrón de distribución similar a las control, con una tinción menor y, nuevamente de forma contrastante, las ratas tratadas con la dosis alta (Fig. 14C) mostraron una sobreexpresión de la proteína con una distribución similar a la de las ratas control.

En los sitios de no implantación del día 6, el patrón de distribución de la Claudina-1 del grupo control (Fig. 14D) y del grupo de dosis alta fue similar al encontrado en los sitios de implantación con una tinción más intensa en el citoplasma y la mitad inferior de la membrana plasmática lateral y muy poca señal en la zona apical. Las ratas tratadas con la dosis baja (Fig. 14E) mostraron un patrón de distribución similar al de las ratas control con una tinción ligeramente más intensa.

En cuanto al día 7 de gestación, en los sitios de implantación la señal proteínica citoplasmática disminuyó con respecto al día 6, sin embargo se mostró con una intensidad similar a lo largo de la membrana plasmática lateral y la zona apical. Se observó una disminución en la intensidad de la señal en la zona lateral de la membrana plasmática en el grupo tratado con dosis baja (Fig. 14H), mientras que

para el grupo de dosis alta (Fig. 14I) se observó una señal más intensa tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática lateral.

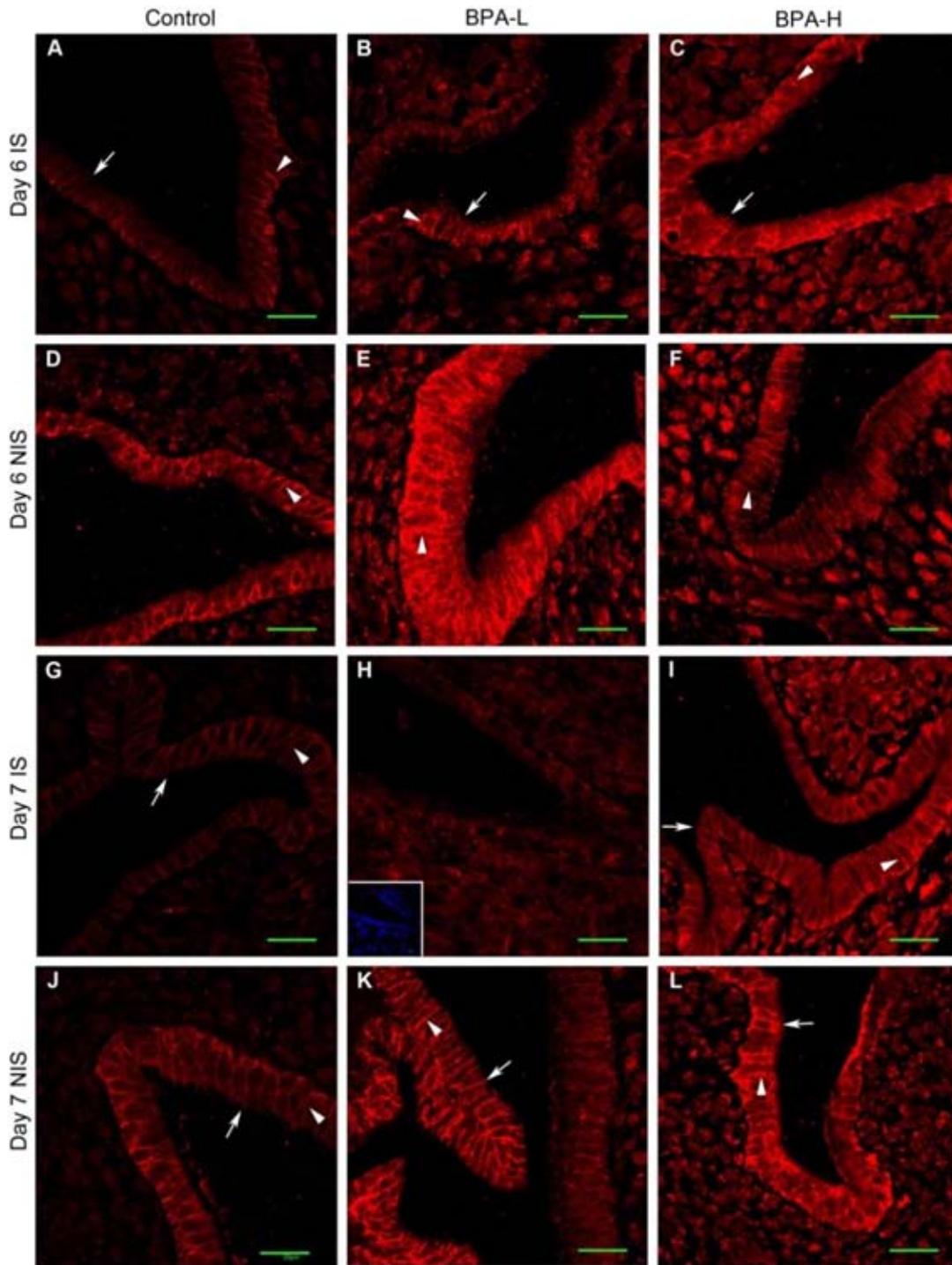


Figura 14. Expresión de Claudina-1 en útero de rata a los días 6 y 7 de gestación de los tres grupos. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. IS: sitios de implantación. NIS: sitios de no implantación. Barra de escala: 20 µm.

También en el día 7, el patrón de distribución de la Claudina-1 en los sitios de no implantación fue similar al de los sitios de implantación pero mostró una señal más intensa, la cual fue aún mayor en el grupo tratado con la dosis alta (Fig. 14L).

8.6.2 ZO-1

En las figuras 15 y 16 se observan imágenes representativas de las pruebas inmunohistoquímicas realizadas con el fin de observar el patrón de expresión de ZO-1 en los úteros recuperados a los días 1, 3, 6 y 7 de gestación de los tres grupos.

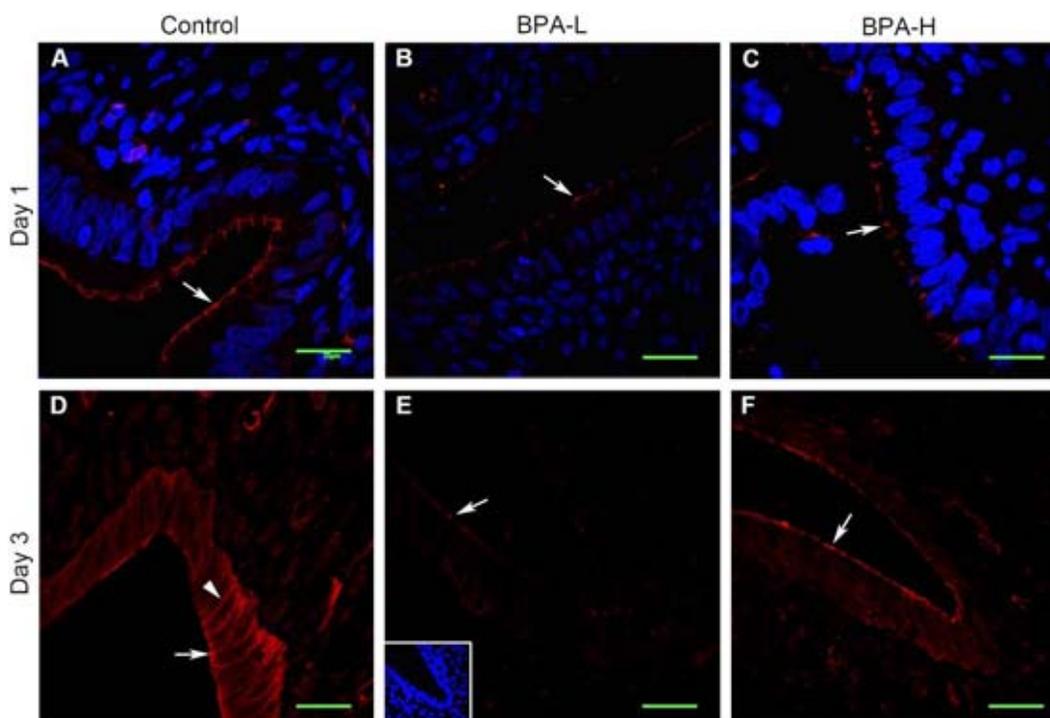


Figura 15. Expresión de ZO-1 en útero de rata a los días 1 y 3 de gestación de los tres grupos. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. Barra de escala: 20 μ m.

En los animales control, ZO-1 se mostró en la zona apical de la membrana plasmática lateral en el día 1 de gestación (Fig. 15A). El grupo tratado con dosis baja (Fig. 15B) mostró un patrón de distribución similar con una menor intensidad de señal, mientras que el grupo tratado con la dosis alta (Fig. 15C) mostró una intensidad de señal intermedia entre los otros dos tratamientos, con un patrón de distribución similar y puntual.

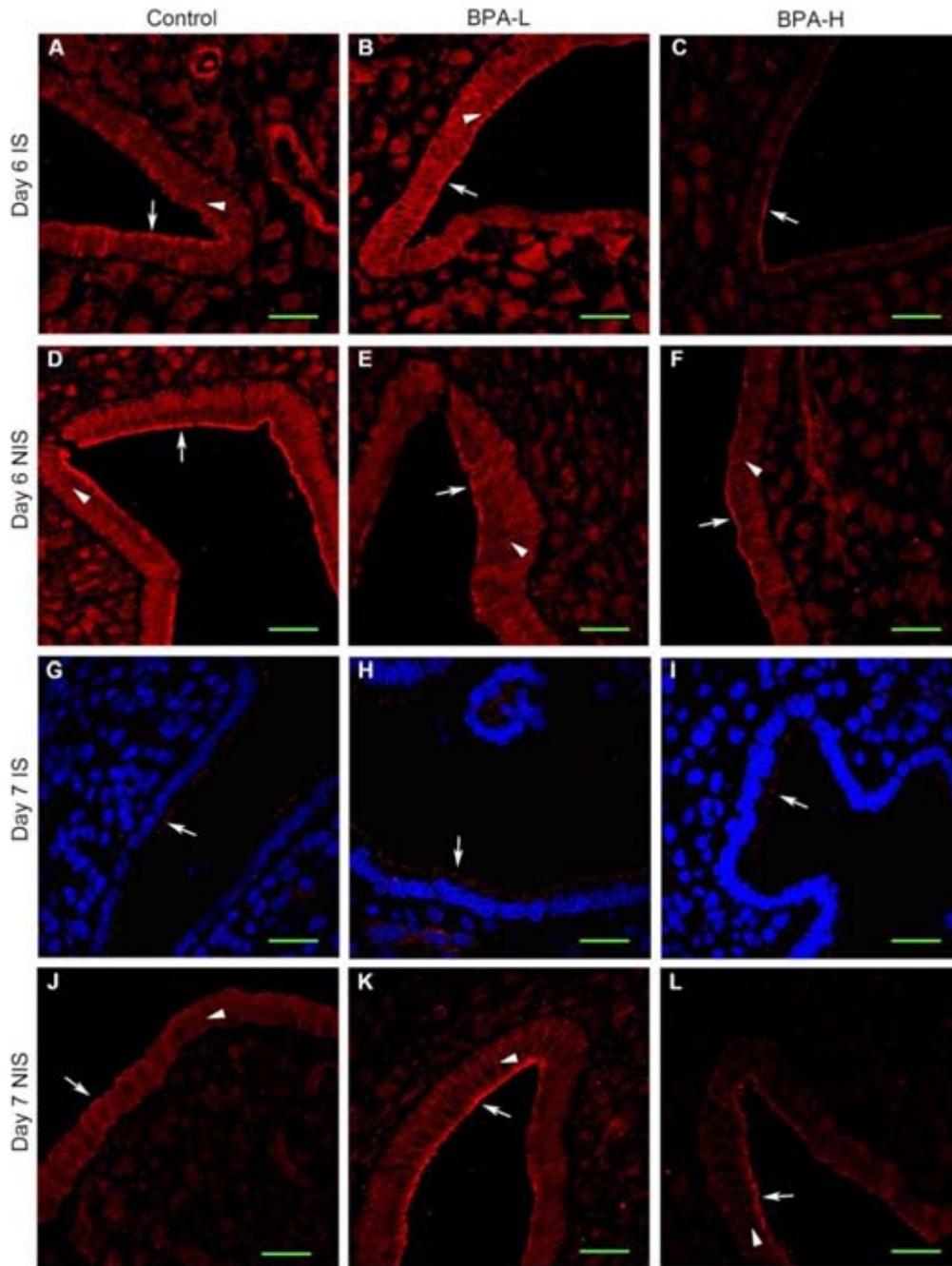


Figura 16. Expresión de ZO-1 en útero de rata a los días 6 y 7 de gestación de los tres grupos. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. IS: sitios de implantación. NIS: sitios de no implantación. Barra de escala: 20 μ m.

Para el día 3, además de la señal apical, la proteína se mostró a lo largo de la membrana plasmática en los animales control (Fig. 15D). Para el grupo de dosis baja (Fig. 15E), la señal fue prácticamente inobservable, mientras que en el grupo de dosis alta (Fig. 15F), la señal fue más intensa en la zona apical que lateral.

En los sitios de implantación observados en el día 6 de gestación de los animales control (Fig. 16A), ZO-1 se expresó en la zona apical de la membrana plasmática lateral, así como en el tercio superior de la misma y de manera difusa en el citoplasma. El grupo tratado con dosis baja (Fig. 16B) presentó una distribución similar pero de mayor intensidad en la señal proteínica. En el grupo tratado con la dosis alta (Fig. 16C), se observó, además de un patrón de expresión similar al de los otros tratamientos, una señal nuclear ligera.

Para este mismo día de gestación, se observó la señal de ZO-1 en las zonas apical y lateral de la membrana plasmática en los sitios de no implantación, con una intensidad mayor que en los de implantación. Se observó el mismo patrón de distribución en las ratas tratadas con ambas dosis de bisfenol-A con una intensidad de señal menor que la presentada en el grupo control (Fig. 16D). Cabe destacar que en este día de gestación, se observa también una ligera señal proteínica en el estroma, además del epitelio, de las ratas control.

Al día 7 de gestación se observó en los sitios de implantación que la tinción de ZO-1 casi había desaparecido, mostrando una señal puntual en el grupo control (Fig. 16G) y en el tratado con dosis baja (Fig. 16H), y una expresión apical en la membrana plasmática lateral en el grupo de dosis alta (Fig. 16I).

En los sitios de no implantación de este mismo día de gestación, se observó que ZO-1 se hallaba en las zona apical y lateral de la membrana plasmática en los tres tratamientos, sin embargo, la intensidad de la señal fue mayor en el grupo tratado con una dosis baja de BPA (Fig. 16K) comparado con el tratado con una dosis alta (Fig. 16L), que a su vez fue mayor que el del grupo control (Fig. 16J).

8.6.3 Ocludina

Así como para Claudina-1 y ZO-1, se realizaron pruebas inmunohistoquímicas en los úteros recuperados a los días 1, 3, 6 y 7 de gestación con el fin de observar la intensidad de señal y el patrón de distribución de la proteína ocludina. Imágenes representativas de estas pruebas se pueden observar en la figura 17. Debido a que no se observó una señal de la ocludina en los días 1 y 3 de gestación, la

figura 17 exhibe únicamente muestras representativas de los sitios de implantación y de no implantación de los úteros a los días 6 y 7 de gestación para los tres tratamientos.

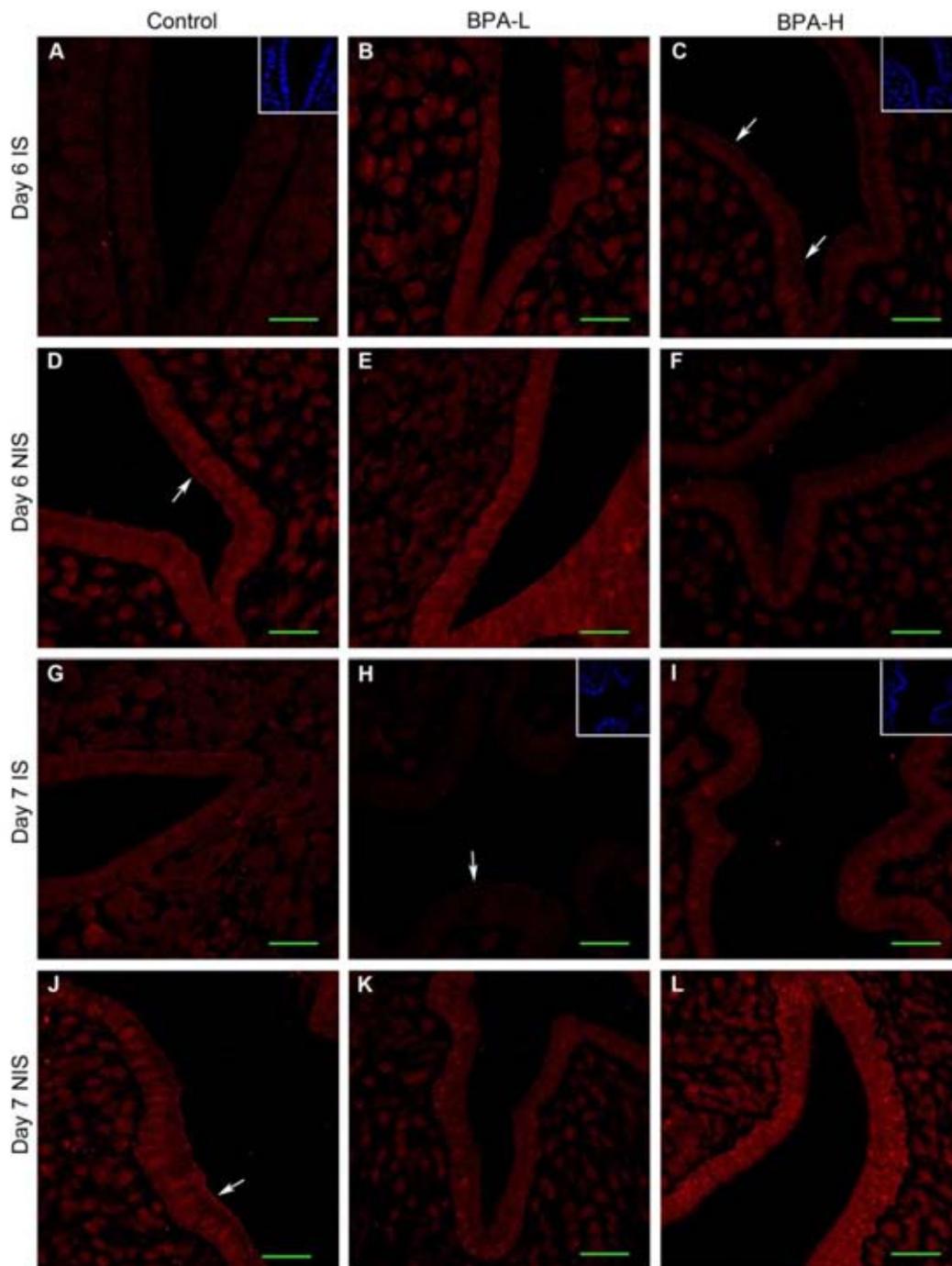


Figura 17. Expresión de Ocludina en útero de rata a los días 6 y 7 de gestación de los tres grupos. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. IS: sitios de implantación. NIS: sitios de no implantación. Barra de escala: 20 μ m.

En los sitios de implantación del día 6, es posible observar que mientras en el grupo control casi no hubo señal de ocludina (Fig. 17A), en el grupo de dosis baja se presentó una leve e inespecífica tinción tanto en el citoplasma de las células epiteliales como en el de las del estroma (Fig. 17B). En cuanto al grupo de dosis alta, la intensidad de señal fue menor que en la de dosis baja, sin embargo se mostró localizada básicamente en el núcleo y en la zona apical de las células epiteliales (Fig. 17C).

Para el mismo día de gestación, se estudiaron también los sitios de no implantación, encontrando una similitud en la intensidad de señal entre el grupo control (Fig. 17D) y el de dosis baja (Fig. 17E), sin embargo, en el grupo control se observó una mayor intensidad en la tinción en la zona apical, mientras que en el grupo de dosis baja la señal fue difusa y poco localizada. En el grupo de dosis alta, la intensidad de la señal se mostró significativamente menor y localizado en el núcleo de la célula (Fig. 17F).

La mayor diferencia en cuanto a intensidad de señal se encontró en los sitios de implantación del día 7 de gestación, ya que en el grupo de dosis baja casi no se observó señal (Fig. 17H), mientras que la intensidad de señal en el grupo control (Fig. 17G) fue similar a la del grupo de dosis alta (Fig. 17I), siendo esta última ligeramente mayor. En cuanto a la distribución de la proteína, en el grupo control no se observó una clara localización de la ocludina, sin embargo la leve señal del grupo de dosis baja mostró un patrón puntual apical en el epitelio luminal, mientras que el grupo de dosis alta exhibió una señal proteínica nuclear.

También al día 7 de gestación, pero en los sitios de no implantación, se observaron diferencias en cuanto a la intensidad y localización de la señal de la ocludina en el útero. Mientras que en el grupo control se observó una señal citoplasmática localizada principalmente en el núcleo y apical en el epitelio luminal (Fig. 17J), tanto en el grupo de dosis baja (Fig. 17K) como en el de dosis alta (Fig. 17L) se observó una señal citoplasmática difusa, siendo la intensidad de señal ligeramente mayor en el grupo de dosis alta que en los otros dos grupos que mostraron una intensidad de señal similar.

Los resultados obtenidos con los ensayos inmunohistoquímicos se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Patrón de distribución e intensidad de expresión de Claudina-1, ZO-1 y ocludina en útero de rata en gestación temprana. BPA-L: grupo tratado con dosis baja de BPA. BPA-H: grupo tratado con dosis alta de BPA. S.I.: sitios de implantación. S.N.: sitios de no implantación. ↑: aumento. ↓: disminución.

Proteína	Control	BPA-L (V.S. Control)	BPA-H (V.S. Control)
Claudina-1			
Día 1	Membranal apical y lateral	Patrón similar, ligero ↑ de tinción	↑↑ tinción membranaral & citoplasmática basal
Día 3	Citoplasmática y membranaral tanto apical como lateral	↓ de señal apical	↑↑ de señal membranaral apical y lateral
Día 6 S.I.	Membranaral lateral intensa y citoplasmática débil	Patrón similar, ↓ tinción	Patrón similar, ↑↑ tinción
Día 6 S.N.	Patrón similar a Día 6 S.I.	Patrón similar, ↑ tinción	Patrón similar
Día 7 S.I.	Patrón similar a Día 6 S.I., ↓ tinción citoplasmática	Patrón similar, ↓ tinción membranaral lateral	Patrón similar, ↑↑ tinción
Día 7 S.N.	Patrón similar a Día 7 S.I., ligero ↑ tinción	Patrón similar	Patrón similar, ↑↑ tinción
ZO-1			
Día 1	Membranaral apical	Patrón similar, ↓ tinción	Patrón similar puntual
Día 3	Membranaral apical y lateral	↓↓↓ tinción	Patrón similar, ↑ tinción apical
Día 6 S.I.	Citoplasmática difusa y membranaral tanto apical como lateral	Patrón similar, ↑ tinción	Patrón similar & ligera tinción nuclear
Día 6 S.N.	Membranaral apical y lateral, ↑ tinción con respecto a S.I. Ligera tinción estromal	Patrón similar, ↓ tinción	Patrón similar, ↓ tinción
Día 7 S.I.	↓↓↓ tinción puntual	Patrón similar	Patrón similar & tinción apical
Día 7 S.N.	Membranaral apical y lateral	Patrón similar, ↑↑ tinción	Patrón similar, ↑ tinción
Ocludina			
Día 6 S.I.	↓↓↓ tinción	Ligera tinción difusa citoplasmática y estromal	Ligera tinción nuclear y membranaral apical
Día 6 S.N.	Membranaral apical	Tinción difusa	Nuclear & ↓ tinción
Día 7 S.I.	↓ tinción apical	↓↓↓ tinción	Nuclear & ↑ tinción
Día 7 S.N.	Nuclear y membranaral apical	Citoplasmática difusa	Citoplasmática difusa & ↑ tinción

9. Discusión

En el presente estudio se evaluó el efecto de dos dosis de BPA sobre distintos parámetros reproductivos y los mecanismos moleculares (proteínas de uniones estrechas) que podrían estar involucrados en el control de la implantación en ratas que recibieron el compuesto a partir del día 6 de gestación (*in útero*) y durante la lactancia a través de su madre (hasta el día postnatal 21).

Tomando en cuenta a las madres (generación F0) que fueron tratadas durante la gestación y lactancia, no se observaron diferencias en el número de crías, ni en la duración de la gestación entre los tres grupos (Tabla 2). Este resultado es similar al encontrado por Cabaton *et al.* (2011) en el que se expuso a ratones a dosis de 0.25 ng, 250 ng y 25 µg de BPA/kg de peso corporal/ día, del día 8 de gestación al día 16 de lactancia, ya que tampoco hallaron diferencias en estos dos parámetros. El estudio realizado por Xiao *et al.* (2011) menciona haber observado una gestación más larga al tratar de forma subcutánea con una dosis de 40 mg/kg de peso corporal/ día, del día 0.5 al 3.5 de gestación, lo que sugiere efectos distintos con dosis y vías de administración distintas. Así mismo, en el estudio de Xiao *et al.*, el BPA se administró antes de que se llevara a cabo la implantación, a diferencia del presente estudio en el que se le empezó a administrar el BPA a la generación F0 a partir del día 6 de gestación, que es cuando se lleva a cabo la implantación.

Se determinó la distancia anogenital de las crías de la generación F1 al día del destete, hallando que ésta aumentó con el BPA con un efecto dosis/respuesta en los machos, mientras que en las hembras no se encontró diferencia significativa. Este resultado es inconsistente con el hallado por Kobayashi *et al.* (2002) en el que no se encontró diferencia en la distancia anogenital de hembras ni de machos al tratar a las madres con 4 y 40 mg de BPA/kg de peso corporal al día del día 6 de gestación al postnatal 20. Otro estudio de Christiansen *et al.* (2014) reporta haber encontrado una disminución en la distancia anogenital tanto de machos como de hembras con dosis de 0.25, 5 y 50 mg de BPA/kg de peso corporal al día del día 7 de gestación al postnatal 22, además de que en las hembras también

observó esta disminución con una dosis de 0.25 mg de BPA/kg de peso corporal. Boudalia *et al.* publicaron en el año 2013 haber observado una disminución de la distancia anogenital en machos de la generación F1 al tratar a las madres con 5 µg orales de BPA/kg de peso corporal al día del día 1 de gestación al día postnatal 21 y luego a la generación F1 con la misma dosis del día del destete al día postnatal 100. Kendig *et al.* (2012) observaron un aumento de la distancia anogenital 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. Los distintos resultados obtenidos sugieren diferentes efectos con distintas dosis, tiempos y vías de exposición al BPA. Los resultados del presente proyecto, apoyan los observados anteriormente que indican que el bisfenol-A, dependiendo de la vía de administración y de la dosis, tiene efectos en la diferenciación sexual de los individuos afectando principalmente la distancia ano-genital de los machos.

Al evaluar el peso de las crías de las madres tratadas, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos en el peso al día del destete ni su aumento en 5 semanas, dato congruente con el estudio ya mencionado de Cabaton *et al.* (2011), así como el realizado por Xiao *et al.* en ese mismo año.

De forma congruente, se encontraron niveles más altos de BPA en el suero de las crías de las ratas tratadas con la dosis alta que las que fueron tratadas con la dosis baja, y a su vez los niveles séricos de BPA del grupo de dosis baja fueron mayores que los niveles del grupo control. Los resultados obtenidos concuerdan con los estudios de Tsutsumi *et al.* (2005) y Ye *et al.* (2006) que mencionan que el BPA se transmite a través de la leche materna, ya que las ratas cuyo suero fue evaluado jamás estuvieron directamente expuestas al BPA, sino que fueron sus madres quienes lo ingirieron durante la gestación y lactancia. Relacionando este resultado con nuestra especie, cabe recordar que los estudios de Ikezuki *et al.* (2002), Padmanabhan *et al.* (2008), Schonfelder *et al.* (2002) y Vandenberg *et al.* (2007) sustentan que el ser humano está expuesto al BPA desde las primeras etapas de gestación, ya que se han detectado altos 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 puede cruzar la placenta. Así mismo, existen estudios que han detectado BPA libre en leche materna humana (Zimmers *et al.*, 2014).

Con respecto a los parámetros reproductivos evaluados, el primero que se hizo evidente fue el índice de fecundación ya que, a pesar de que las hembras mostraron una conducta sexual receptiva, no todas las del grupo de dosis alta resultaron preñadas. Mientras que el índice de fecundación del grupo de dosis baja no se vio afectado, el del grupo de dosis alta disminuyó casi en un 10 % con respecto al grupo control. El estudio de Cabaton *et al.* (2011) ya mencionado también sugiere un menor índice de fecundación de los animales tratados con BPA, a pesar de ser dosis mucho menores que las trabajadas en el presente proyecto. Un estudio de Varayoud *et al.* (2011) en el que se les administró de forma subcutánea 0.05 mg y 20 mg de BPA/kg de peso corporal al día a ratas en los días postnatales 1, 3, 5 y 7, concuerda con lo anteriormente mencionado, ya que aunque todas las ratas mostraron receptividad sexual, el 10 % de las ratas de la dosis baja y 23 % de las de dosis alta no se preñaron.

En cuanto a las tasas de ovulación, no se encontró diferencia significativa entre los tres grupos, resultado consistente con diversos estudios. Como ejemplo de los estudios mencionados, se encuentra el de Berger *et al.* (2010) en el que no se hallaron diferencias en el número de cuerpos lúteos en animales tratados con 100, 200 y 300 mg de BPA/kg de peso corporal al día del día 1 al 4 de gestación. Además, el estudio ya mencionado de Varayoud *et al.* (2011) también reporta no haber encontrado diferencias en las tasas de ovulación de las ratas tratadas. El grupo de Fernández *et al.* (2010) publicó haber realizado un estudio en el que se administró de forma subcutánea el BPA del día postnatal 1 al 10 en dosis de 2.5 a 6.2 mg/kg de peso corporal al día (BPA50) y 25 a 62.5 mg/kg de peso corporal al día (BPA500), hallando que los animales del grupo BPA500 eran infértiles, ya que no presentaron óvulos la mañana del estro, mientras que los del grupo BPA50 presentaban una fertilidad reducida sin cambios en las tasas de ovulación. Estos

resultados sugieren que los efectos del BPA son posteriores o no afectan la ovulación.

Uno de los resultados más representativos del presente proyecto fue la disminución en la tasa de implantación del grupo de dosis alta con respecto al control, ya que es un indicio claro de una fertilidad reducida. Diversos estudios concuerdan con lo observado en el presente proyecto; el ya mencionado estudio de Berger *et al.* (2010), el también ya mencionado estudio de Xiao *et al.* (2011), otro estudio de Berger *et al.* (2007) en el que se administró de manera subcutánea el BPA del día 1 a 4 de gestación con dosis de 3.375 y 10.125 mg de BPA/día y el nuevamente mencionado estudio de Varayoud *et al.* (2011) denotan una reducción en la tasa de implantación de los animales tratados con BPA.

Al día 18 de gestación, se evaluó el número de embriones y de sitios de reabsorción de los tres grupos, sin encontrar diferencia significativa en ninguno de los dos parámetros. Tanto Cabaton *et al.* (2011), como Xiao *et al.* (2011), Berger *et al.* (2007) y Fernández *et al.* (2010) reportan haber encontrado un menor número de crías para los animales tratados con BPA. De igual manera, el estudio de Varayoud *et al.* (2011) menciona haber observado un aumento en el número de sitios de reabsorción en los animales tratados. Los resultados obtenidos en el presente experimento son incongruentes tanto como con los hallados por la mayor parte de los estudios de la bibliografía, como con la disminución de la tasa de implantación encontrado en el presente proyecto y en varios de los estudios mencionados. Esta incongruencia puede ser resultado de la variación natural en el número de crías que puede tener una rata de la cepa Wistar, ya que se encuentra en un intervalo de 8 a 14 crías por camada. Debido a que la "N" de experimentación es reducida, es posible que no permita distinguir entre la variación normal en el número de crías y el posible efecto del disruptor endócrino. Cabe destacar que debido a los días de gestación evaluados con el fin de observar las proteínas de las uniones estrechas, el número de ratas consideradas para determinar las tasas de implantación fue del doble que las consideradas para evaluar el número de embriones y sitios de reabsorción.

Es importante mencionar que la mayor parte de los estudios de la literatura evalúan la fertilidad de la generación F0 o la F2, mientras que en el presente proyecto se evalúa a la F1, sin embargo se toman únicamente como parámetro comparativo.

Debido a la inexistencia de estudios previos que evalúen el efecto del BPA sobre las proteínas de las uniones estrechas que podrían estar relacionadas con el proceso de implantación, los artículos con los cuales se comparan los resultados obtenidos en el presente proyecto mencionan únicamente los patrones de distribución proteínica observados en condiciones normales de gestación y/o los cambios que sufren al alterar los niveles hormonales del animal.

Un estudio de Orchard *et al.* (2002) en el que se observaron por inmunohistoquímica las tres proteínas de las uniones estrechas estudiadas en el presente proyecto también en los días 1, 3, 6 y 7 de gestación en el útero de rata, reporta haber observado la señal proteínica de la Claudina-1 en el día 1 de gestación a lo largo de toda la membrana plasmática lateral, con mayor intensidad en la zona apical y con una señal difusa en el citoplasma. A excepción de la señal citoplasmática, los resultados de este estudio concuerdan con lo hallado en el presente proyecto en cuanto a la señal apical y lateral de la Claudina-1 al día 1 de gestación en el grupo control. Otro estudio realizado por Nicholson *et al.* (2010) también menciona haber observado la señal proteínica citoplasmática de la Claudina-1 al día 1 de gestación en rata, por lo que hay una diferencia notable con los resultados hallados en el presente proyecto. Esta diferencia puede deberse al procesamiento de los tejidos, ya que en ambos estudios de referencia, los tejidos fueron conservados por congelación, mientras que en el presente estudio fueron deshidratados y parafinados, lo que podría afectar la sensibilidad de detección de las proteínas. Al día 3 de gestación, los resultados de este experimento muestran en las ratas control a la Claudina-1 tanto en las zonas apical y lateral de la membrana plasmática como en el citoplasma de las células epiteliales uterinas, resultado similar al del estudio ya mencionado de Orchard *et al.* (2002). Este mismo estudio reporta haber observado un aumento considerable de la señal

apical de la Claudina-1 en los días 6 y 7 de gestación, siendo aún mayor en el sexto día, mientras que el estudio de Nicholson *et al.* (2010) reporta haber observado nuevamente una señal citoplasmática. Los resultados del presente estudio muestran una tendencia contraria a la publicada por Orchard *et al.*, ya que en el sexto día la señal apical disminuyó, sin embargo también se observó la señal citoplasmática mencionada por Nicholson *et al.* (2010) que disminuyó considerablemente al día 7.

Al comparar el patrón de distribución y la intensidad de la señal proteínica de los tres grupos estudiados, puede notarse que en el día 1 de gestación, el patrón de distribución de la Claudina-1 no presentó una variación notable entre los tratamientos. Sin embargo, la señal proteínica se observó más intensa en los grupos tratados con BPA que en el control, lo que resulta en una unión con más fibras proteínicas y por lo tanto menos permeable. Esta característica puede generar complicaciones debido a que debe existir un intercambio continuo entre fluidos luminales y estromales antes del proceso de implantación. Este mismo fenómeno se observó en el día 3, ya que nuevamente se halló una sobreexpresión de la proteína en las ratas tratadas con la dosis alta, mientras que el grupo de dosis baja no mostró una señal apical como los otros dos grupos, lo que resulta en un transporte transcelular menos impedido, que afecta la constitución del fluido uterino. La sobreexpresión de Claudina-1 en el grupo de dosis alta se observó nuevamente en los sitios de implantación del día 6 de gestación, mientras que el grupo de dosis baja presentó una señal menos intensa que el control tanto en la zona lateral como apical de la membrana plasmática. Esta última descripción implica que la unión estrecha era más permeable de lo normal en el sitio de implantación. Tanto el aumento como la disminución de la Claudina-1 en la unión estrecha podrían afectar la implantación del blastocisto, ya que en etapas tempranas del embarazo es deseable un intercambio más facilitado de fluidos entre el lumen y el estroma, sin embargo en el momento de la implantación, es deseable un epitelio menos permeable (Murphy *et al.*, 1981, 1982 & 1993). En los sitios de no implantación del día 6, los grupos control y dosis alta mostraron un patrón similar en el que la Claudina-1 se mostró principalmente en la zona lateral

de la membrana con una señal citoplasmática difusa, sin embargo el grupo de dosis baja presentó una sobreexpresión proteínica en particular en la zona lateral de la membrana y, debido a que es una zona del epitelio en la que no hay un blastocisto implantado, la dificultad de transporte que genera podría no ser deseable. En los sitios de implantación del día 7, la señal proteínica disminuyó en el citoplasma de las ratas control, mientras que, al igual que en los sitios de implantación del día 6, el grupo de dosis alta presentó una sobreexpresión proteínica y el grupo de dosis baja una señal más débil que la del grupo control. Estos cambios en la concentración de la Claudina-1 podrían afectar la penetración del blastocisto a través del epitelio luminal hasta el estroma materno, ya que este proceso se lleva a cabo durante este día de gestación. De manera contrastante, en los sitios de no implantación del séptimo día, se invirtieron los efectos de ambas dosis con respecto al día 6, ya que el grupo de dosis baja mostró un patrón de distribución y una intensidad de señal similares a los del grupo control, mientras que el grupo de dosis alta nuevamente presentó una sobreexpresión.

Comparando los resultados de ZO-1 del presente estudio con los hallados por otros investigadores, puede mencionarse que las ratas control mostraron una señal proteínica en la zona apical de la membrana plasmática en los 4 días evaluados, dato congruente con el reportado por Orchard *et al.* (2002) que menciona que en los días 1, 3 6 y 7 de gestación, ZO-1 exhibe una señal apical. El mencionado estudio también reporta haber observado una señal difusa de ZO-1 en el citoplasma basal en el día 1 de gestación, sin embargo en el presente estudio únicamente se observó una señal citoplasmática en el sexto día de gestación, por lo que nuevamente pueden atribuírsele las diferencias al procesamiento del tejido. Cabe destacar que en el día 7 de gestación, la señal proteínica de ZO-1 fue muy débil, sin embargo su ligera y puntual señal se encontró en la zona apical como lo describen Orchard *et al.* (2002). De igual manera, la señal proteínica en los úteros de las ratas control de ZO-1 no se observó más que en el epitelio en los días 1 y 3 de gestación, es decir, antes del proceso de implantación, sin embargo en los días 6 y 7, es decir, en el momento de y después de la implantación, la señal se encontró, además de en el epitelio

luminal, en el estroma. Este último resultado es similar al obtenido por Paria *et al.* (1999), que mencionan haber observado que ZO-1 estuvo presente en las células epiteliales uterinas de ratón en los días de gestación previos a la implantación y que en el día de la implantación y los días posteriores, se observó además en el estroma, en la zona decidual primaria.

Discutiendo las diferencias entre tratamientos en cuanto al patrón de distribución y la intensidad de la señal proteínica, en el día 1, los tres grupos presentaron una señal apical de ZO-1. Sin embargo, la intensidad de señal disminuyó con los tratamientos, siendo más notable en el grupo de dosis baja. Esta disminución implica una menor cantidad de ZO-1 en el epitelio, lo que a su vez resulta en uniones estrechas menos estables. Además, la señal del grupo de dosis alta fue puntual, lo que significa que ZO-1 no está localizada a lo largo de todo el epitelio sino exclusivamente en las zonas de las uniones estrechas y por lo tanto su unión con el citoesqueleto de actina puede ser menor comparada con las ratas del grupo control. Esta última afirmación resultaría, nuevamente, en una unión estrecha menos estable. En el día 3, nuevamente se observó una disminución notable en la intensidad de señal del grupo de dosis baja, sugiriendo de igual manera lo anteriormente mencionado. De forma contrastante, el grupo de dosis alta presentó una mayor señal apical que lateral, sin embargo su patrón de expresión fue ligeramente distinto al del grupo control, en el que se observó una intensidad de señal equilibrada entre la zona apical y la zona lateral de la membrana plasmática. En los sitios de implantación del día 6, las ratas control mostraron una señal tanto apical como citoplasmática difusa, mientras que el grupo de dosis baja presentó un patrón similar de mayor intensidad y el grupo de dosis alta un patrón similar de intensidad similar con una tinción nuclear adicional. Es congruente la señal citoplasmática en este día de gestación debido a que, al ser deseable una unión estrecha más estable e impermeable en el momento de la implantación, es necesario anclar más fibras proteínicas intercelulares con el citoesqueleto de actina, por lo que es necesaria también una mayor cantidad de ZO-1 en el lado citoplasmático de la membrana plasmática. A pesar de que su patrón de distribución fue similar al del grupo control, el grupo de dosis baja presentó una

ligera sobreexpresión proteínica, lo que podría resultar desfavorable ya que se requiere una disminución en la permeabilidad pero no un epitelio completamente impermeable. En los sitios de no implantación del día 6 de gestación, se encontró una disminución en la expresión de ZO-1 en los grupos de ratas tratadas con BPA con respecto al grupo control, lo que nuevamente puede interferir con la permeabilidad paracelular. En los sitios de implantación del día 7, la señal proteínica fue muy débil en los tres grupos, sin embargo, la señal del grupo control y del grupo de dosis baja fue puntual, mientras que la del grupo de dosis alta fue apical. Al considerar que después de realizarse la implantación, el blastocisto debe penetrar el epitelio hacia el estroma, es posible deducir que es necesaria una reducción en la estabilidad de las uniones estrechas del sitio de implantación, lo que sería congruente con la disminución en la señal proteínica mencionada. De igual manera, cabe destacar que la comparación entre los tres grupos permite observar que el grupo de dosis alta podría representar una desaparición tardía de la proteína con respecto a los otros dos grupos. En los sitios de no implantación, sin embargo, no se observó la disminución de ZO-1 observada en los sitios de implantación, sino que la señal proteínica se mostró tanto en la zona apical como en la lateral de la membrana plasmática de los tres grupos, presentando una señal más intensa en los grupos de ratas tratadas con BPA. La localización de la proteína es congruente con lo anteriormente mencionado, sin embargo un exceso de proteína debido al disruptor podría dificultar fenómenos de transporte necesarios después de la implantación.

Al tomar en cuenta la literatura, el estudio de Orchard *et al.* (2002) coincide con los resultados del presente proyecto al reportar la ausencia de señal proteínica de la ocludina a los días 1 y 3 de gestación y su aparición al día 6. Este estudio menciona que en los días 6 y 7 de gestación, la localización de la ocludina se observó en la zona apical del epitelio. El experimento también ya mencionado de Nicholson *et al.* (2010) menciona haber observado que aumentó 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 progesterona. Este estudio sugiere que la expresión de la ocludina está regulada

por la cantidad de progesterona, ya que no se observaron los mismos efectos en ratas ovariectomizadas tratadas únicamente con estrógenos. Sugieren también que es probable que exista un pool citoplasmático de ocludina que migra en el momento de la implantación hacia las uniones estrechas. En contraste, en el presente estudio se observó, además de la señal apical, una señal proteínica citoplasmática de ocludina en los sitios de no implantación de los días 6 y 7 de gestación, por lo que nuevamente se le puede atribuir la diferencia al procesamiento del tejido.

Con respecto a las diferencias en los patrones de distribución e intensidad de señal proteínica entre los tres grupos, se puede notar que en los sitios de implantación del día 6, la señal de ocludina fue muy débil en las ratas control, mientras que en el grupo de dosis baja fue citoplasmática y difusa tanto en el epitelio como en el estroma. El grupo de dosis alta mostró una señal menos intensa que la del grupo de dosis baja, tanto apical como nuclear. De acuerdo con la literatura (Nicholson *et al.*, 2010), en el momento de la implantación, la ocludina se observa en las zonas de las uniones estrechas y ya no presenta 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 era esperado 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. De igual manera, en los sitios de no implantación se observó el patrón mencionado en las ratas control, ya que la señal proteínica que presentaron fue intensa y apical, como era esperado, mientras que la del grupo de dosis baja, aunque de intensidad similar, fue difusa y poco localizada, sugiriendo nuevamente una migración tardía de la proteína. En cuanto al grupo de dosis alta, la señal proteínica observada fue nuclear y muy débil, lo que podría indicar una ausencia total de la migración proteínica en este punto de la gestación. En los sitios de implantación del día 7, la señal proteínica del grupo de dosis baja fue muy débil y puntual en la zona apical, mientras que la del grupo de dosis alta nuevamente fue nuclear únicamente. Ambas observaciones apoyan la teoría anteriormente mencionada al observar el día 6 de gestación. Así como las observaciones de los

sitios de implantación del día 7, las de los sitios de no implantación son consistentes con la discusión, ya que mientras que las ratas control mostraron una señal tanto nuclear como apical, las ratas de los grupos tratados únicamente mostraron una señal citoplasmática difusa que a su vez fue más intensa en el grupo de dosis alta.

De manera consistente con el presente proyecto, la mayor parte de los estudios realizados con BPA han evidenciado que sus efectos, como los de diversos disruptores endócrinos, no son dosis/respuesta (Berger *et al.*, 2010; Cabaton *et al.*, 2011; Bosquiazzo *et al.*, 2010), lo que implica que si se observa un efecto a cierta dosis, no necesariamente se amplificará con una dosis mayor.

Al abordar las posibles causas de los efectos observados en el presente estudio del disruptor endócrino bisfenol-A sobre la salud reproductiva de las ratas, se encuentra una amplia gama de posibles mecanismos de acción. Además, se ha observado una enorme variación en dichos efectos, por lo que es preciso mencionar que distintas dosis, la exposición al compuesto en diferentes etapas de la vida, la evaluación de la fertilidad en distintas generaciones, el tiempo de exposición al compuesto, las distintas vías de administración, el distinto tratamiento de los tejidos evaluados, las diferentes especies de animales estudiadas y los diferentes tejidos en los cuales se han estudiado los efectos del BPA son sólo algunos de los factores que tienen influencia sobre los resultados observados.

El artículo de Berger *et al.* (2010) concluye, de acuerdo con lo observado, que la disminución en las tasas de implantación como efecto del BPA puede deberse a los cambios en la morfología del útero y/o a niveles alterados de hormonas esteroides, ya que modifican la proliferación celular y afectan el transporte del blastocisto del oviducto hacia el útero. El estudio de Hiyama *et al.* (2011) menciona que es posible que el BPA provoque la metilación o desmetilación del DNA y con ello la disrupción del sistema endócrino, ya que la metilación regula la expresión de genes relacionados con el desarrollo y el crecimiento. A manera de ejemplo, se ha encontrado que la exposición postnatal a dosis ambientalmente

relevantes de BPA causa una alteración de la expresión del gen HOXA10 en el útero (Varayoud *et al.*, 2008), y ya que se sabe que este gen está involucrado en la preparación del útero para la implantación, la alteración de su expresión podría resultar en una menor tasa de implantación. De igual forma se ha reportado que una exposición *in útero* a BPA genera desmetilación del gen HOX que está involucrado en el desarrollo del oviducto, útero, cérvix y vagina superior, lo que sugeriría un mecanismo epigenético. Además, es sabido que el estradiol y la progesterona regulan la expresión de este gen, por lo que además del mecanismo epigenético mencionado, nuevamente se incluye la alteración de niveles séricos de hormonas esteroides como posible causa de los efectos del BPA.

Como ya se ha mencionado, el BPA tiene capacidad estrogénica, es decir, tiene afinidad por los receptores de estrógenos, sin embargo hay estudios que demuestran que cantidades de BPA demasiado bajas como para activar los receptores de estrógenos también tienen efectos celulares (Sekizawa *et al.*, 2008). Se ha sugerido que además de unirse a los receptores nucleares, el BPA también se une a los receptores membranales de estrógenos e incluso interacciona con receptores a estrógenos distintos a los clásicos.

De igual forma, se cree que la alteración de la receptividad del útero puede ser a nivel de hipotálamo por un incremento en la expresión de los receptores a progesterona (Berger *et al.*, 2007). De hecho, debido a la amplia gama de efectos, algunos investigadores piensan que es posible que el disruptor endócrino afecte el eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (Varayoud *et al.*, 2011).

Otra posible causa de la disminución en las tasas de implantación es mencionada por Bosquiazzo *et al.* (2010), que concluyen que la exposición neonatal a BPA altera la proliferación de las células de los vasos sanguíneos como respuesta a hormonas ováricas en la etapa adulta y, ya que la generación de nueva vascularización estromal es esencial para la implantación y el desarrollo del embrión, disminuyen estas tasas. Es sabido que el proceso de vascularización depende en parte de los estrógenos y la progesterona, por lo que sugieren que las

alteraciones pueden estar a nivel de receptores nucleares, niveles hormonales séricos o a nivel de expresión de genes hormono-dependientes.

Ya se ha mencionado que no existen investigaciones previas que evalúen el efecto del BPA sobre las proteínas de las uniones estrechas, sin embargo sí existen estudios que muestran que las uniones estrechas están bajo la influencia de hormonas ováricas (Murphy *et al.*, 1982). Se ha demostrado que altos niveles de estrógenos, como los que hay en el día 1 de gestación, resultan en una unión estrecha de fibras paralelas con pocas interconexiones, sin embargo en el momento de la implantación, con un aumento en los niveles de progesterona, la unión estrecha del epitelio luminal uterino aumenta su profundidad y sus interconexiones proteínicas (Murphy *et al.*, 1981 & 1982) lo que, a su vez, resulta en una unión menos permeable. Estas aseveraciones permiten deducir que una alteración en los niveles séricos de hormonas esteroides debidas a un disruptor endócrino estrogénico podrían ser una causa de una decremento de la fertilidad del organismo, sin embargo aún se desconoce el mecanismo preciso por el cual actúa el bisfenol-A.

10. Conclusiones

- Hay una gran cantidad de estudios que señalan que el BPA tiene efectos en el sistema reproductivo, tanto de machos como de hembras. Así mismo, se ha demostrado que este efecto es mayor si los individuos están expuestos a los disruptores endócrinos durante el desarrollo del sistema reproductivo, por lo que en el presente trabajo se les administró a las ratas madres durante la gestación y la lactancia el BPA (a diferentes dosis) para evaluar el efecto sobre las crías.
- Con respecto al día de gestación en el que nacieron las crías, el número de crías nacidas vivas, el número de crías al día del destete, el peso al día del destete y el incremento de peso a lo largo de un mes después del destete, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las camadas de las madres control y las tratadas con el compuesto, sin embargo, uno de los primeros parámetros que se pueden estudiar para ver el efecto de disruptores endócrinos sobre el sistema reproductivo es la distancia anogenital de las crías y esta distancia fue, en los machos con tratamiento de BPA (para ambas dosis), significativamente mayor que las del grupo control. En las hembras se observó una ligera tendencia a disminuir la distancia anogenital con el aumento de la dosis, sin embargo no fue estadísticamente significativa.
- De igual manera, se comprobó que el BPA consumido por la madre es transferido a las crías durante la gestación y lactancia, ya que se encontraron niveles significativamente más altos del compuesto en las ratas tratadas con respecto a las control. Se observó también una congruencia en la cantidad del compuesto hallado en el suero de las crías con respecto a la dosis administrada a la madre.

- En cuanto a los parámetros reproductivos evaluados, se observó un menor índice de fecundación para las crías de las ratas tratadas con una dosis alta (20 mg/kg de peso corporal al día) con respecto a las control, sin embargo las crías de las ratas tratadas con una dosis baja (0.05 mg/kg de peso corporal al día) no mostraron este comportamiento.
- Tampoco se observó diferencia estadística significativa en cuanto a las tasas de ovulación, número de embriones al día 18 de gestación o número de sitios de reabsorción al día 18 de gestación para las ratas de los tres tratamientos, sin embargo, sí se encontró una diferencia estadística significativa en cuanto al número de sitios de implantación (cuantificados a los días 6 y 7 de gestación) en las ratas control y las ratas tratadas con la dosis alta de BPA, siendo el número de sitios de implantación de estas últimas, menor. Este resultado, además de ser congruente con estudios similares previamente realizados, significa una alteración en un parámetro reproductivo importante que sugiere una disminución en la fertilidad de las ratas debido al disruptor endócrino evaluado. La inconsistencia entre los otros parámetros reproductivos evaluados en los que no se encontró diferencia estadísticamente significativa y las tasas de implantación, puede deberse al número de ratas utilizadas para evaluar cada parámetro, ya que las tasas de implantación, al ser cuantificadas en dos días de gestación en lugar de uno, tienen una "N" del doble que las de los otros parámetros. De igual manera, existe una variación normal amplia con respecto a las crías que puede tener una rata wistar, ya que pueden ir desde 8 hasta 14, en los casos más extremos, por lo que una N pequeña difícilmente muestra diferencia estadística significativa aunque ésta existiera en un experimento de una N mucho mayor.
- A nivel molecular, es decir, observando la expresión de tres proteínas de las uniones estrechas con una posible función en el proceso de

implantación e incluso en la nutrición del embrión, se pudieron observar diversas diferencias entre las ratas control y las tratadas.

- Estos cambios inducidos por el BPA alteran la composición y permeabilidad de las uniones estrechas, lo cual contribuye al cambio en el transporte paracelular y en la remodelación y función de la membrana apical de las células epiteliales, con lo que puede explicarse la disminución en las tasas de implantación observadas.
- Cabe mencionar que los efectos de los disruptores endócrinos no siempre son “dosis-respuesta”, ya que sus mecanismos de acción son diversos y complicados. Así, no es incongruente que el compuesto muestre efectos distintos con dosis distintas y sobre proteínas distintas.

En resumen, se observaron cambios significativos en los animales expuestos al disruptor endócrino bisfenol-A durante la gestación y lactancia con respecto a los animales control. Estos cambios involucran el desarrollo sexual (distancia anogenital al día postnatal 21), el número de sitios de implantación a los días 6 y 7 de gestación después de ser fecundadas y los patrones de distribución e intensidad de expresión de proteínas de las uniones estrechas relacionadas con la implantación.

Finalmente, es de suma importancia llevar a cabo estudios que permitan comprender mejor los mecanismos de acción a nivel molecular y los efectos del BPA sobre el organismo, ya que el ser humano está expuesto constante e inadvertidamente a este disruptor endócrino y podría tener consecuencias dañinas sobre su salud reproductiva.

11. Referencias

- Alavi N, Lianos EA, Palant CE, Bentzel CJ. "Induction of epithelial tight junctions by a light chain protein isolated from a patient with Fanconi's syndrome". *Nephron*, 1983. 35(2): p. 130-5.
- Balda MS, Matter K.. "The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression". *EMBO J*, 2000. 19(9): 2024-33.
- Becker K, Goen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Muller J, Wittassek M, Schulz C, Kolossa-Gehring M. "Ger ES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children". *Int J Hyg Environ Health*, 2009; 212:685-692.
- Berger RG, Hancock T, deCatanzaro D. "Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice". *Reprod Toxicol*. 2007 Feb;23(2):138-44. Epub 2006 Sep 29.
- Berger RG, Shaw J, deCatanzaro D. "Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol". *Reprod Toxicol*. 2008 Oct;26(2):94-9. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.06.007. Epub 2008 Jun 27.
- Berger RG, Foster WG, deCatanzaro D. "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* 2010; 30: 393–400.
- Bosquiaz VL, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque EH, Ramos JG. "Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus". *Biol Reprod*. 2010 Jan;82(1):86-95. doi: 10.1095/biolreprod.109.078543. Epub 2009 Aug 19.
- Boudalia S, Berges R, Chabanet C, Folia M, Decocq L, Pasquis B, Abdennebi-Najar L, Canivenc-Lavier MC. "A multi-generational study on low-dose BPA

exposure in Wistar rats: effects on maternal behavior, flavor intake and development". *Neurotoxicol Teratol.* 2014 Jan-Feb;41:16-26. doi: 10.1016/j.ntt.2013.11.002. Epub 2013 Nov 20.

-Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS, Zalko D, Schaeberle CM, Askenase MH, Gadbois JL, Tharp AP, Whitt GS, Sonnenschein C, Soto AM. "Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice". *Environ Health Perspect.* 2011; 119(4): 547-52

-Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. "Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population". *Environ Health Perspect,* 2005; 113:391–395.

-Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. "Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004". *Environ Health Perspect* 2008; 16:39–44

-Calafat AM, Weuve J, Ye X, Jia LT, Hu H, Ringer S, Huttner K, Hauser R. "Exposure to Bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants". *Environ Health Perspect,* 2009; 117:639–644

-Cantonwine D, Meeker JD, Hu H, Sánchez BN, Lamadrid-Figueroa H, Mercado-García A, Fortenberry GZ, Calafat AM, Téllez-Rojo MM. "Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study". *Environ Health,* 2010; 18;9:62

-Caserta D, Bordi G, Ciardo F, Marci R, La Rocca C, Tait S, Bergamasco B, Stecca L, Mantovani A, Guerranti C, Fanello EL, Perra G, Borghini F, Focardi SE, Moscarini M. "The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women". *Gynecol Endocrinol.* 2013; 29(5): 444-7.

-Christiansen S, Axelstad M, Boberg J, Vinggaard AM, Pedersen GA, Hass U. "Low-dose effects of BPA on early sexual development in male and female rats". *Reproduction.* 2014 Mar 2;147(4):477-87. doi: 10.1530/REP-13-0377. Print 2014.

-Cohen E, Talmon A, Faff O, Bacher A, Ben-Shaul Y. "Formation of tight junctions in epithelial cells. I. Induction by proteases in a human colon carcinoma cell line". *Exp Cell Res*, 1985. 156(1): p. 103-16.

-Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA, Flaws JA, Berry KF, Calafat AM, Ye X, Petrozza JC, Wright D, Hauser R. "Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization". *Environ Health Perspect*. 2012; 120(7): 978-83.

-Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. "The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton". *J Biol Chem*. 1998 Nov 6;273(45):29745-53.

-Farquhar MG, & Palade GE. "Junctional Complexes in various epithelia". *J Cell Biol*. 1963. 17:375-412.

-Fernández M, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Libertun C. "Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats". *Environ Health Perspect*, 2010; 118(9): 1217-22.

-Fujimoto T, Kubo K, Aou S. "Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats". *Brain Res.*, 2006. 1068, 49–55.

-Geens T, Apelbaum TZ, Goeyens L, Neels H, Covaci A. "Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market". *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010 Nov;27(11):1627-37. doi: 10.1080/19440049.2010.508183.

-Gumbiner BM. "Breaking through the tight junction barrier". *J Cell Biol*, 1993. 123: 1631-1633.

-Ghassemifar MR, Sheth B, Papenbrock T, Leese HJ, Houghton FD, Fleming TP. "Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates

lacking the fourth transmembrane domain". *J Cell Sci*, 2002. 115(Pt 15): p. 3171-80.

-Gilula NB, Fawcett DW, Aoki A. "The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis". *Dev Biol*, 1976. 50(1): p. 142-68.

-Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL. "Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules". *Kidney Int*, 2000a. 57(6): p. 2386-402.

-Hanioka N, Jinno H, Nishimura T, Ando M. "Suppression of male-specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver". *Arch Toxicol* 1998; 72: 387–394.

-Hiyama M, Choi EK, Wakitani S, Tachibana T, Khan H, Kusakabe KT, Kiso Y. "Bisphenol-A (BPA) affects reproductive formation across generations in mice". *J Vet Med Sci*. 2011; 73(9): 1211-5.

-Hassold T, Hunt P. "To ERR (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy". *Nat Rev Genet*, 2001. 2:280–291.

-He Y, Miao M, Herrinton LJ, Wu C, Yuan W, Zhou Z, Li DK: (2009). Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res*, 109:629-633.

-Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. "Low dose effects of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction". *Reprod Toxicol*, 2002. 16:117–122.

-Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. "Exposure to bisphenol A advances puberty". *Nature* 1999; 401:763–764., transformation of rat uterine epithelium. *Biol Cell*. 79(2): p. 111-6.

-Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. "Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure". *Hum Reprod*, 2002. 17:2839–2841.

-Inoue K, Kawaguchi M, Funakoshi Y, Nakazawa H. "Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography–mass spectrometry". *J. Chromatogr. B*, 2003. 798, 17–23.

-Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S. "The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy". *J Cell Biol*. 1993 May;121(3):491-502.

-Kandaraki E, Chatzigeorgiou A, Livadas S, Palioura E, Economou F, Koutsilieris M, Palimeri S, Panidis D, Diamanti-Kandarakis E. "Endocrine disruptors and polycystic ovary syndrome (PCOS): elevated serum levels of bisphenol A in women with PCOS". *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96(3): E480-4.

-Kendig EL, Buesing DR, Christie SM, Cookman CJ, Gear RB, Hugo ER, Kasper SN, Kendzioriski JA, Ungi KR, Williams K, Belcher SM. "Estrogen-like disruptive effects of dietary exposure to BPA or 17 α -ethinyl estradiol in CD1 mice". *Int J Toxicol*. 2012. Epub 2012 Nov 15.

-Kobayashi K, Miyagawa M, Wang RS, Sekiguchi S, Suda M, Honma T. "Effects of in utero and lactational exposure to BPA on somatic growth and anogenital distance in F1 rat offspring". *Ind Health*. 2002 Oct;40(4):375-81.

-Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S. "Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions". *Curr Biol*. 1999 Sep 23;9(18):1035-8.

-Leach L, Lammiman MJ, Babawale MO, Hobson SA, Bromilou B, Lovat S, Simmonds MJ. "Molecular organization of tight and adherens junctions in the human placental vascular tree". *Placenta*. 2000 Jul-Aug;21(5-6):547-57.

-López-Cervantes J, Paseiro-Losada P. "Determination of Bisphenol A and its migration from, PVC stretch film used for food packaging". *Food Additives and Contaminants*, 2003. 20, Issue 6.

-Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. "Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations". *PLoS One*. 2013; 8(1): e55387.

-Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. "In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland". *Biol Reprod*, 2001. 65:1215–23.

-Markey CM, Coombs MA, Sonnenschein C, Soto AM. "Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs". *Evol Dev*, 2003. 5:67-75.

-Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Foureman GL, Morita M, Kawamoto T. "Bisphenol A levels in human urine". *Environ. Health Perspect.*, 2003. 111, 101–104.

-Melnick R, Lucier G, Wolfe M, Hall R, Stancel G, Prins G, Gallo M, Reuhl K, Ho SM, Brown T, Moore J, Leakey J, Haseman J, Kohn M. "Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review". *Environ Health Perspect*. 2002; 110(4): 427-31.

-Mendoza-Rodríguez CA, González-Mariscal L, Cerbón M. "Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle". *Cell Tissue Res*, 2005. 319(2): p. 315-30.

-Mendoza-Rodríguez CA, García-Guzmán M, Baranda-Avila N, Morimoto S, Perrot-Appanat M, Cerbón M. "Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring". *Reprod Toxicol*, 2011. Nov 3

-Mok-Lin E, Ehrlich S, Williams PL, Petrozza J, Wright DL, Calafat AM, Ye X, Hauser R. "Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF". *Int J Androl*. 2010; 33(2): 385-93.

-Murphy CR, Rogers AW. "Effects of ovarian hormones on cell membranes in the rat uterus. III. The surface carbohydrates at the apex of the luminal epithelium". *Cell Biophys*, 1981. 3(4): p. 305-20.

-Murphy CR, Swift JG, Mukherjee TM, Rogers AW. "Changes in the fine structure of the apical plasma membrane of endometrial epithelial cells during implantation in the rat". *J Cell Sci*, 1982. 55: p. 1-12.

-Murphy CR. "The plasma membrane of uterine epithelial cells: structure and histochemistry". *Prog Histochem Cytochem*. 1993; 27(3): 1-66.

-Murphy CR, Shaw TJ. "Plasma membrane transformation: a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period". *Cell Biol Int*, 1994. 18(12): p. 1115-28.

-Murphy CR. "Junctional barrier complexes undergo major alterations during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells". *Hum Reprod*, 2000a. 15 Suppl 3: p. 182-8.

-Murphy CR, Hosie MJ, Thompson MB. "The plasma membrane transformation facilitates pregnancy in both reptiles and mammals". *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2000b. 127(4): 433-9.

-Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV.. "Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol". *Environ. Health Perspect.*, 1997. 105, 70–76.

-Nava k, Mendoza-Rodríguez CA, Romano-Riquer P, Cerbón MA. "Impacto endocrino de sustancias químicas de uso común". *Revista de Educación Química*, 2008. Segunda época vol. 19 núm. 1. 27-33.

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

-Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E. "Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract". *Reprod Toxicol* 2007; 24, 253–258.

-Nicholson MD, Lindsay LA, Murphy CR. "Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy". *Acta Histochem*, 2010. 112(1): 42-52.

-Orchard MD, Murphy CR. "Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat". *Acta Histochem*, 2002. 104(2): p. 149-55.

-Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S, Johnson T, Pinkerton J, Anderson L, Tao L, Kannan K. "Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem?" *J Perinatol*, 2008. 28(4):258–263.

-Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S. "Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice". *Environ. Res.*, 2008. 108, 150–157.

-Paria BC, Zhao X, Das SK, Dey SK, Yoshinaga K. "Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization". *Dev Biol*. 1999 Apr 15;208(2):488-501.

-Pistek VL, Fürst RW, Kliem H, Bauersachs S, Meyer HH, Ulbrich SE. "HOXA10 mRNA expression and promoter DNA methylation in female pig offspring after in utero estradiol-17 β exposure". *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013; 138: 435-44.

-Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS. "In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies". *Reprod. Toxicol*. 2007a; 24, 199–224.

-Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. "Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels". *Environ Health Perspect*, 2001. 109:675-80.

-Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. "Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A". *Endocrinology*. 2006 Aug;147(8):3681-91. Epub 2006 May 4.

-Rudel RA, Gray JM, Engel CL, Rawsthorne TW, Dodson RE, Ackerman JM, Rizzo J, Nudelman JL, Brody JG. "Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention". *Environ Health Perspect.*, 2011. doi: 10.1289/ehp.1003170.

-Ryan BC, Vandenberg JG. "Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice". *Hormones and Behavior*, 2006. 50:85–93.

-Schönfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I. "Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol A on the uterus of rat offspring". *Neoplasia* 2004; 6:584–94.

-Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. "Parent bisphenol A accumulation in the human maternal–fetal–placental unit". *Environ Health Perspect* 2002a; 110:A703–A707.

-Schönfelder G, Flick B, Mayr E, Talsness C, Paul M, Chahoud I. "In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina". *Neoplasia*, 2002. 4:98–102.

-Schneeberger EE, & Lynch RD. "Structure, function and regulation of cellular tight junctions". *Am J Physiol*, 1992. 262: L647-L661.

- Sekizawa J. "Low-dose effects of bisphenol A: a serious threat to human health?". *J Toxicol Sci* 2008;33:389–403.

- Souter I, Smith KW, Dimitriadis I, Ehrlich S, Williams PL, Calafat AM, Hauser R. "The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments". *Reprod Toxicol*. 2013; 42: 224-31.
- Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K. "Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage". *Hum. Reprod.*, 2005; 20: 2325–2329.
- Tachibana T, Wakimoto Y, Nakamuta N, Phichitraslip T, Wakitani S, Kusakabe K, Hondo E, Kiso Y. "Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice". *J Reprod Dev*. 2007 Jun;53(3):509-14. Epub 2007 Mar 23.
- Takao Y, Lee Ho C, Kohra S, Arizono K. "Release of BPA from food can lining upon heating". *J Health Sci*. 2002; 48,331-334.
- Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. "Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction". *Endocr J*. 2004; 51(2):165-9.
- Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Kamei Y, Osuga Y, Fujiwara T, Takai Y, Momoeda M, Yano T, Taketani Y. "Elevated serum bisphenol A levels under hyperandrogenic conditions may be caused by decreased UDP-glucuronosyltransferase activity". *Endocr J* 2006; 53: 485–491.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. "Multifunctional strands in tight junctions". *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(4): p. 285-93.
- Tsutsumi O. "Assessment of human contamination of estrogenic endocrine disrupting chemicals and their risk for human reproduction". *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 93:325–330
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. "Human exposure to bisphenol A (BPA)". *Reprod Toxicol*, 2007. 24:139–177.

-Van Itallie & Anderson. "Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts". *J Cell Sci.* 1997 May;110 (Pt 9):1113-21.

-Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "Developmental exposure to bisphenol A impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult". *Endocrinology*, 2008. 149:5848–5860

-Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Lower M, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. "Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites". *Endocrinology*, 2011. 152(3): p. 1101-11.

-Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, LeBlanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT. "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". *Reprod. Toxicol.*, 2007. 24, 131–138.

-Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. "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". *Toxicol Ind Health*, 1998. 14:239–260.

-Wang X, Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Paria BC. "Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation". *J Cell Sci*, 2004. 117(1): 53-62.

-Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. "Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure". *Endocrinology*, 2006. 147(Suppl. 6), S56–S69.

-Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. "Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3". *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):35179-85.

-Xiao S, Diao H, Smith MA, Song X, Ye X. "Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice". *Reprod Toxicol*. 2011; 32(4): 434-41.

-Yamamoto, T., Yasuhara, A. "Quantities of BPA leached from plastic waste samples". *Chemosphere*, 1999. 38, 2569- 2576.

-Yamano Y, Miyakawa S, Iizumi K, Itoh H, Iwasaki M, Tsugane S, Kagawa J, Nakadate T. "Long-term study of urinary bisphenol A in elementary school children". *Environ Health Prev Med*, 2008. 13:332-337.

-Yang M, Kim SY, Lee SM, Chang SS, Kawamoto T, Jang JY, Ahn YO. "Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2003. 44, 546–551.

-Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. "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* 2006; 831(1–2):110–115.

-Ye X, Pierik FH, Hauser R, Duty S, Angerer J, Park MM, Burdorf A, Hofman A, Jaddoe VW, Mackenbach JP, Steegers EA, Tiemeier H, Longnecker MP. "Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study". *Environ Res*, 2008. 108:260-267.

-Ye X, Pierik FH, Angerer J, Meltzer HM, Jaddoe VW, Tiemeier H, Hoppin JA, Longnecker MP. "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*, 2009. 212:481-491

-Yoshida T, Horie M, Hoshino Y, Nakazawa H. "Determination of Bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography". *Food Addit. Contam.* 2001; 18, 69– 75.

-Zhou W, Liu J, Liao L, Han S, Liu J. "Effect of Bisphenol A on steroid hormone production in rat ovarian theca-interstitial and granulosa cells". *Mol Cell Endocrin* 2008; 283:12–18

-Zimmers SM, Browne EP, O'Keefe PW, Anderton DL, Kramer L, Reckhow DA, Arcaro KF. "Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method". *Chemosphere*. 2014 Jun;104:237-43. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.12.085. Epub 2014 Feb 4.