



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“Efecto de la administración perinatal del disruptor endocrino Bisfenol-A sobre la expresión de las proteínas de adhesión focal: Talina y Paxilina, en el útero de ratas durante la gestación temprana”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**LAURA LIZZETH MÉNDEZ CARRILLO**



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2018.



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: Luz del Carmen Castellanos Román  
VOCAL: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez  
SECRETARIO: Samuel Canizales Quinteros  
1er. SUPLENTE: Claudia Teresa Tovar Palacio  
2do. SUPLENTE: Alfonso Rafael Salgado Aguayo

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 206, Edificio F1, Facultad de Química, UNAM con dirección en Circuito Interior, S/N, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México, CP. 04510.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. Carmen Adriana Mendoza  
Rodríguez

**SUSTENTANTE:**

---

Laura Lizzetth Méndez Carrillo

## **Agradecimientos:**

Al P.A.I.P. 5000-9141, al P.A.P.I.I.T. IA209316, al P.A.P.I.I.T. RA209316 y al P.A.P.I.I.T. IA207118 por su contribución en el aporte de los recursos necesarios para realizar el proyecto; A la M.V.Z. Lucía Macías R., la M. en C. Marisol Rivera H. y al personal del bioterio del edificio E, por su apoyo y participación con el manejo de animales en los experimentos realizados; A la Dra. Karina Jiménez de la unidad de microscopía confocal de la USAI de la facultad de química, por la obtención de las imágenes de microscopía confocal plasmadas en este trabajo.

# Índice

1.	Resumen.....	6
2.	Introducción.....	7
3.	Antecedentes .....	8
3.1.	Disruptores Endocrinos .....	8
3.2.	Bisfenol A (BPA).....	10
3.2.1.1.	Consumo de Bisfenol A (BPA) .....	11
3.2.1.2.	Efecto de la exposición al Bisfenol A (BPA) en fertilidad.....	13
3.2.1.3.	Efecto de la exposición al Bisfenol A (BPA) en implantación .....	17
3.3.	Implantación .....	19
3.3.1.	Adhesiones focales.....	20
3.3.1.1.	Talina.....	22
3.3.1.2.	Paxilina.....	23
3.3.1.3.	Mecanismo de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales	25
3.3.1.4.	Adhesiones focales en el útero de rata durante el embarazo temprano	29
3.3.1.5.	Efecto del BPA sobre la expresión de las proteínas de adhesión focal	31
4.	Planteamiento del problema.....	32
5.	Hipótesis .....	33
6.	Objetivo .....	33
6.1.	Objetivos particulares .....	34
7.	Metodología .....	34
7.1.	Animales de experimentación.....	34
7.1.1.	Dosis de Bisfenol A (BPA) para la realización de este trabajo .....	34

7.2.	Tratamiento de animales .....	35
7.3.	Preparación de tejidos para microscopía de Inmunofluorescencia....	36
7.4.	Inmunofluorescencia.....	36
8.	Resultados .....	37
8.1.	Día 1 de gestación.....	38
8.2.	Día 3 de gestación.....	40
8.3.	Día 6 de gestación.....	41
8.4.	Día 7 de gestación.....	43
8.5.	Tabla comparativa de los resultados de los tratamientos con Bisfenol A 45	
9.	Discusión.....	46
10.	Conclusiones.....	54
11.	Perspectivas.....	55
12.	Referencias .....	55

## **Índice de abreviaturas**

BPA: Bisfenol-A

BPA-H: Dosis Alta de BPA (20 mg/kg/día)

BPA-L: Dosis Baja de BPA (0.05 mg/kg/día)

CEU: Células epiteliales uterinas

DG: Día de gestación

E<sub>2</sub>: 17β-estradiol

ECM: Matriz extracelular

EDC: Compuesto de disrupción endocrina

FAK: Cinasa de adhesión focal

Fig.: Figura

P<sub>4</sub>: Progesterona

PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

## 1. Resumen

El Bisfenol-A (BPA) es un producto químico de alto volumen de producción utilizado en una variedad de productos de consumo común. Más notablemente, está presente en plásticos de policarbonato, en los revestimientos de resina epoxi de latas de aluminio, y en recipientes térmicos, entre otros productos. Se ha demostrado, tanto en experimentos in vivo como in vitro, que el BPA actúa como disruptor endocrino (que interrumpe las acciones normales de hormonas endógenas), y que estamos expuestos diariamente a este compuesto.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración de BPA en la expresión de proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, en ratas de la generación F1, las cuales recibieron el compuesto durante el periodo de la gestación y la lactancia a través de su madre (F0).

Las ratas Wistar embarazadas (F0) recibieron: BPA-L (0.05 mg/kg/día), BPA-H (20 mg/kg/día) o vehículo, desde el día de gestación (DG) hasta el día 21 de lactancia. Las hembras F1 fueron apareadas a los 3 meses de edad y sacrificadas en los DG 1, 3, 6 y 7. Se evaluó la expresión de proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, en el útero de las hembras F1. Se observaron diferencias en cuanto a la expresión y localización de las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, en el epitelio uterino de los grupos de ratas tratadas con BPA comparándolos con el grupo control. Estos cambios observados en los grupos tratados con BPA, nos indican que el tratamiento perinatal con BPA induce cambios en la expresión y localización de las proteínas paxilina y talina en las células epiteliales uterinas (CEU), durante los primeros días de la gestación que podrían afectar el proceso de implantación del blastocisto.



## **2. Introducción**

El BPA 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 [1]. El BPA es un disruptor endocrino, y 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 [2,3].

Se ha reportado que el BPA tiene la capacidad de migrar desde el polímero hacia el alimento [4,5], lo que significa que las personas que consumen alimentos contenidos en empaques cuyo material contiene BPA, también ingieren el compuesto [6,7]; además, hay estudios 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 [8,9]. Así mismo, otras investigaciones demuestran que 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 [10].

Debido al aumento de la producción de alimentos empacados, se ha incrementado la exposición en la vida cotidiana del ser humano al BPA, por lo que 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 proteínas de adhesión focal del epitelio uterino de ratas hembras Wistar las cuales recibieron el compuesto durante el periodo de la gestación y la lactancia a través de su madre.

### **3. Antecedentes**

#### 3.1. Disruptores Endocrinos

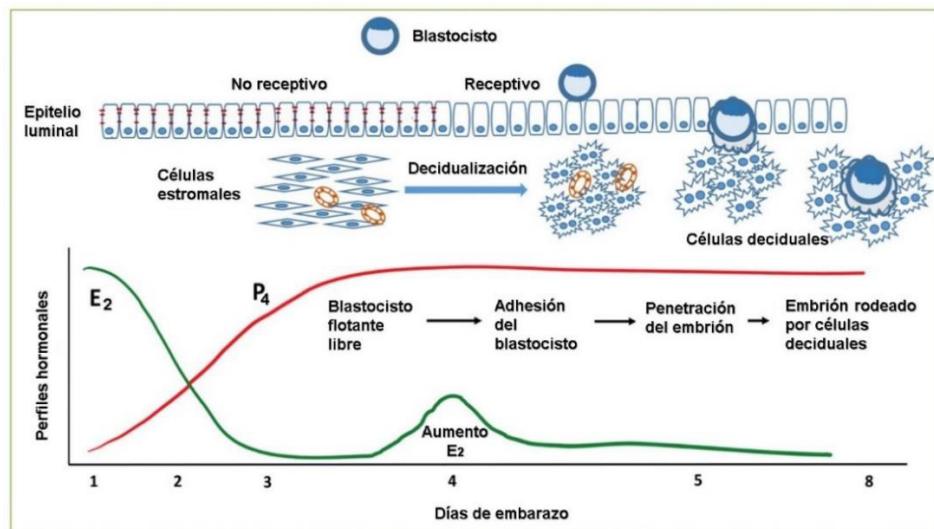
Los compuestos de disrupción endocrina (por sus siglas en inglés, EDC), son sustancias químicas, naturales o artificiales, exógenas al organismo que tienen la capacidad de alterar la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, actividad de unión o eliminación de hormonas naturales que están presentes en el organismo y son responsables de la homeostasis del sistema endocrino, el reproductivo, y procesos de desarrollo, tanto del ser humano como el de los animales [2,3]. Los EDC interrumpen las acciones normales de hormonas endógenas. Muchos contaminantes ambientales, incluyendo los policlorobifenilos (PCB), las dioxinas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), ftalatos, el BPA, los plaguicidas, los alquifenoles y los metales pesados (arsénico, cadmio, plomo, mercurio), han demostrado que alteran significativamente el equilibrio endocrino [1].

En las últimas décadas, se ha aumentado la inquietud respecto a la disrupción del sistema endocrino en los organismos vivos por los productos químicos orgánicos sintéticos, ya que se cuenta con conocimiento de que en el medio ambiente existen numerosos compuestos EDC que ejercen actividad hormonal [1].

Se ha propuesto que la actividad de disrupción endocrina de muchos de los compuestos, incluyendo el BPA, se debe a una interferencia agonista y/o antagonista con las vías esteroideas implicadas en el desarrollo y la función del sistema reproductor masculino y femenino [11]. Estas interferencias pueden ocurrir a través de vías múltiples, incluyendo la unión a los receptores de esteroides y proteínas de unión a esteroides o modulando enzimas esteroideogénicas en el cuerpo. La unión de los EDC, como BPA, a receptores hormonales representa una posible forma de interferir en las interacciones naturales ligando-proteína y conducir así a una alteración perjudicial en el funcionamiento normal de los órganos blanco para los esteroides [12]. En general, los EDCs modulan la función hormonal en el cuerpo y, en particular, afectan el equilibrio de hormonas esteroideas [1].

Las funciones fisiológicas del útero de los mamíferos se rigen por las acciones concertadas de las hormonas esteroideas  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ).

Estas hormonas actúan a través de sus receptores afines para controlar la proliferación y diferenciación de las células uterinas endometriales y hacer que el útero sea competente para el establecimiento de un embarazo temprano. Específicamente, el E<sub>2</sub> postovulatorio, promueve el crecimiento del revestimiento uterino estimulando la proliferación de células epiteliales uterinas (CEU). En respuesta al aumento del nivel de P<sub>4</sub> que secreta el cuerpo lúteo recién formado, el epitelio deja de proliferar y activa vías de diferenciación para facilitar la inserción y la invasión del embrión (Fig. 1) [13,14].



*Fig. 1 Eventos críticos para el establecimiento de embarazo temprano en ratón. Tomado y modificado de Bhurke et al.[14].*

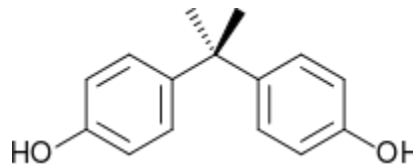
Posteriormente, las células estromales subyacentes proliferan y se diferencian a células deciduales, que mantiene un ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo del embrión durante la gestación. Por lo tanto, la morfogénesis decidual adecuada es un requisito previo para el éxito de la implantación y el establecimiento del embarazo [13,14].

El receptor de progesterona (PR), a través de la activación por la progesterona, tiene un comportamiento central en diversos eventos reproductivos asociados con el establecimiento y mantenimiento del embarazo, la función ovárica, el desarrollo alveolar en la mama y el comportamiento sexual [15].

### 3.2. Bisfenol A (BPA)

El BPA es uno de los contaminantes emergentes más detectados en el entorno [16]. Fue sintetizado a principios del siglo 20 a partir de dos moléculas de fenol (bisfenol) unidos por una molécula de acetona. Por lo tanto, su estructura se constituye de dos anillos de fenilo conectados por un carbono, con dos grupos funcionales metilo unidos al puente (Fig. 2) [4,16]. El bajo valor del  $K_{ow}$  (coeficiente de reparto octanol-agua) indica que el BPA es fuertemente hidrófobo y tiene un bajo potencial de bioacumulación [1,16].

El peso molecular de BPA es 228 g/mol con relativamente baja solubilidad en agua (120 a 300 mg/L) en comparación con fenol cuya solubilidad es de  $8,20 \times 10^4$  mg/L a 25 °C. Sin embargo, su solubilidad tiende a aumentar cuando se disuelve en disolventes polares orgánicos o soluciones acuosas con condiciones alcalinas. Este fenómeno es debido a sus constantes de disociación (pKa) que están en el rango de 9.6 a 10.2 [16].



*Fig. 2. “2,2’-bis(4-hidroxifenil) propano” comúnmente nombrado Bisfenol A (BPA)*

El BPA fue diseñado originalmente con la finalidad de ser un estrógeno sintético, debido a su acción sobre el útero de roedores. De hecho, el dietilestilbestrol, un análogo estructural, se encontró que era mucho más potente. Tiempo después, el BPA ha sido ampliamente utilizado por sus propiedades de entrecruzamiento, ya que como única molécula de hidrocarburo, el BPA se une con otra molécula para formar polímeros en todo proceso de fabricación [16]; utilizándose en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epóxicas, así como en la producción de resinas de fenol, poliacrilatos y poliésteres [4].

Las resinas epóxicas son utilizadas como recubrimiento interno protector de latas que contengan alimentos; piezas de automóviles, adhesivos y como revestimientos para tuberías de PVC. Los plásticos de policarbonato se utilizan en la fabricación de

discos compactos, lentes, electrodomésticos, envases de alimentos y botellas de plástico, ya que tienen alta resistencia al impacto, dureza, tenacidad, transparencia, resistencia a temperaturas entre -40 °C a +145 °C y resistencia a muchos ácidos y aceites [1,17].

Se ha observado en contenedores de plástico o en contenedores con recubrimientos de plástico que el BPA migra del contenedor hacia los alimentos y bebidas contenidas debido a la polimerización incompleta y la degradación de los polímeros por la exposición a altas temperaturas, tales como el uso de microondas, o exposición a soluciones ácidos o alcalinas. Así mismo, puede ser liberado a partir de dispositivos médicos o de productos hechos con estos materiales (plásticos de policarbonato y resinas epóxicas, resinas de fenol, poliacrilatos y poliésteres) [4,5]. Dicha capacidad de migración aumenta con la exposición a altas temperaturas o con el uso constante del producto [18–20]. De hecho, la principal vía de contacto humana con el BPA son los alimentos [21] y es el principal compuesto estrogénico que se fuga a las fuentes de agua y alimento [22]. 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 éste 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 [21].

#### 3.2.1.1. Consumo de Bisfenol A (BPA)

Debido a las ventajas reales en términos de resistencia al calor y elasticidad, el uso de BPA ha aumentado progresivamente en todo el mundo, con una producción anual, superior a 10 millones de toneladas en el 2013. Se ha convertido en omnipresente en muchos productos domésticos, tales como bolsas de plástico, botellas, latas recubiertas, selladores dentales a base de resina y agentes de unión, pinturas, CD-ROM, etc. [4].

El consumo mundial de BPA se ha visto estimulado por un crecimiento estable de la demanda de los mercados emergentes, con China, India, México y Rusia se espera presenciar un crecimiento de consumo por encima de las perspectivas de crecimiento promedio. Acoplado a esta tendencia, hay una demanda creciente por el compuesto en sus dos áreas de aplicación principales, es decir, resinas epóxicas y policarbonatos. La prospectiva para la demanda futura de BPA es susceptible de ser reforzada por la creciente utilización de este producto químico en los compuestos de las aspas del rotor que tienen aplicación en las turbinas eólicas. La energía eólica ha ido obteniendo una gran atención mundial como una opción ecológica en la producción energética, y requiere el uso de aspas del rotor de la turbina fuertes y resistentes a los vientos, que son reforzadas mediante resinas epóxicas [16].

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.

La exposición a concentraciones nanomolares ambientales de BPA es frecuente y continua, principalmente a través de la ingestión, inhalación y contacto con la piel. En los seres humanos, el BPA no conjugado activo libre es metabolizado en el hígado por la enzima 5 -difosfo-glucuronosiltransferasa a BPA glucurónido o por la enzima sulfotransferase 1A1 a BPA sulfato (y eliminado a través de depuración renal [4,23,24]. Estudios sugieren que los altos niveles de BPA en orina podrían estar correlacionados con el consumo de alimentos enlatados [25–28].

Está presente en la orina de 90% de los casos en una población de referencia de Estados Unidos de América (0.2 a 1.6 ng/mL), así como en sangre, leche materna (0.6-3.41 µg/L) y líquido amniótico [4,23]. En otros países como Holanda (1.1 µg/L),

Alemania (2.7 µg/L), China (2.84 µg/L), Japón (0.6 µg/L) y Bélgica (2.22 µg/L), se ha reportado en orina una amplia exposición de la población al BPA [29–33].

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 [8,9]. De igual manera, los bebés en unidades neonatales de cuidados intensivos pueden tener una mayor exposición al BPA debido al uso de aditamentos médicos [34].

En México, se han realizado varios estudios en los que se ha detectado la presencia de BPA tanto en niños y adolescentes de ambos sexos (0.8 µg/L), así como en orina de mujeres embarazadas (rango < 0.4 µg/L a 6.7 µg/L) [35,36].

El ser humano está expuesto a BPA desde las primeras etapas de gestación, ya que se han detectado altos niveles de BPA en el fluido folicular ovárico (2.4 µg/L), la sangre de cordón umbilical (2.2 µg/L), en plasma materno (2.97 µg/L) y fetal (rango 0.2-9.2 µg/L), en fluido amniótico (0.26-8.3 µg/L) y en tejido placentario (11.2 µg/L), lo que indica que el BPA no se une a la alfafetoproteína que secuestra a los estrógenos y puede cruzar la placenta [37–40].

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 [10], la exposición durante la gestación y lactancia es de particular interés.

#### 3.2.1.2. Efecto de la exposición al Bisfenol A (BPA) en fertilidad

La infertilidad femenina se define generalmente como la incapacidad para quedar embarazada naturalmente y entregar un recién nacido vivo y sano. El porcentaje de mujeres infértiles en las últimas décadas se ha incrementado alcanzando el 30% en todo el mundo. La infertilidad en las mujeres puede ser el resultado de varios factores, incluyendo problemas físicos, problemas endocrinos, hábitos de estilo de vida y factores ambientales. Los factores ambientales, como la exposición a sustancias químicas con propiedades de alteración endocrina, pueden imitar o bloquear la actividad endocrina de las hormonas endógenas y, por lo tanto, afectar negativamente a la reproducción [41].

El BPA es un disruptor endocrino con actividad estrogénica, la cual es aproximadamente  $1 \times 10^4$  veces menor que la del  $E_2$  [42].

En estudios se ha observado que las dosis bajas de BPA pueden producir efectos adversos si se administran durante el desarrollo del organismo. Estos efectos incluyen la apertura vaginal temprana, alteraciones en el ciclo estral y en los niveles circulantes de hormona luteinizante, cambios a largo plazo en la vagina, el útero, la glándula mamaria y de los ovarios [43]. Otros estudios han sugerido efectos endocrinos perjudiciales adversos de dosis bajas de BPA en los adultos, como la disminución en la cantidad y la calidad de la producción de esperma, la disminución de la fertilidad en los hombres, los abortos involuntarios recurrentes, alteraciones persistentes en el desarrollo de la glándula mamaria peripuberal y el síndrome de ovario poliquístico. Así mismo, se han descrito efectos sobre el feto, tales como una mayor incidencia de hipospadias y criptorquidia, la estimulación del desarrollo de las glándulas mamarias, hiperplasia endometrial y cariotipos anormales [1]. En el sistema reproductor femenino, el BPA afecta a las glándulas mamarias, los ovarios, el oviducto, el útero, y la placenta [5].

En los últimos años, varios grupos de investigación han examinado los efectos del BPA sobre la fertilidad global. Se realizaron estudios epidemiológicos donde se examinaron si los niveles de BPA son más altos en mujeres infértiles en comparación con mujeres fértiles, como lo es el estudio realizado por Caserta et al. [44] donde analizaron los niveles séricos de EDC como el BPA, entre otros y la expresión de los receptores nucleares (NRs) con el fin de tener una indicación de la dosis interna de compuestos biológicamente activos y una medición de los indicadores de sus efectos, como resultado de la captación repetida de la fuente ambiental. El porcentaje de pacientes con concentraciones detectables de BPA fue significativamente mayor en los pacientes infértiles en comparación con los sujetos fértiles (72.9% en comparación con 23.1%,  $p < 0.01$ ).

En otro estudio realizado por La Rocca et al. [45], los niveles en sangre y suero de varios disruptores endocrinos (ED) como el BPA, entre otros, fueron evaluados simultáneamente con los niveles de expresión génica de los receptores nucleares



(NRs) en células mononucleares de sangre, en mujeres estériles y fértiles voluntarias de áreas metropolitanas, urbanas y rurales italianas. Las mujeres infértiles del área metropolitana mostraron niveles significativamente más altos de BPA en comparación con las mujeres fértiles (14.9 frente a 0.5 ng/mL de suero).

Las conclusiones de estos estudios, Caserta et al. [44] y La Rocca et al. [45], indican que las mujeres infértiles tienen mayores niveles de BPA en suero en comparación con las mujeres fértiles.

No todos los estudios epidemiológicos encontraron una asociación entre la exposición al BPA y los resultados de fertilidad; como lo son el estudio realizado por Buck Louis et al. [46] donde evaluaron las concentraciones urinarias de BPA y ftalato y la fecundidad de parejas según el tiempo de embarazo (por sus siglas en inglés, TTP), el trabajo realizado por Vélez et al. [47] en el cual evaluaron el efecto potencial del BPA, del triclosán (TCS) y de los ftalatos sobre la fecundidad de las mujeres, medida por el TTP; y el trabajo de Jukic et al. [48] donde investigaron el BPA y ciertos ftalatos en relación con las longitudes de las fases folicular y lútea, el tiempo hasta el embarazo y la pérdida precoz del embarazo (dentro de las 6 semanas del último período menstrual) entre las mujeres que intentaban embarazarse. Entre estos estudios se informaron asociaciones nulas entre las concentraciones totales de BPA en la orina y la fecundidad deteriorada o el tiempo de embarazo en mujeres generalmente sanas.

Los estudios que utilizan modelos animales proporcionan más información sobre los efectos de la exposición al BPA en la fertilidad femenina. En ratones, Berger et al. [49] informaron que la exposición a bajas dosis de BPA de los animales gestantes durante el período de preimplantación redujo significativamente el número de camadas y el tamaño de la camada comparado con los controles. Cabaton et al. [50] realizaron un estudio de crianza forzada y encontraron que las hembras expuestas a BPA de dosis baja tenían menos embarazos y un menor número total acumulado de crías en comparación con los controles.

Además, la exposición *in vitro* a dosis bajas de BPA después de la implantación afectó la fertilidad de las hembras en las generaciones posteriores, como se

describe en los trabajos de Wang et al. [51] y de Ziv-Gal et al. [52], donde también se informó de una disminución de la fertilidad en un estudio que examinó los efectos de la exposición *in vitro* a dosis bajas de BPA en tres generaciones posteriores de ratones.

La investigación de Wang et al. [51] en la cual expuso ratones FVB al BPA (0.5, 20, o 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) desde el día de gestación (DG) 11 hasta el nacimiento, causó efectos significativos en la generación F1, desde pubertad precoz, alteraciones del ciclo estral e incremento del peso corporal. Así mismo, en el grupo tratado con 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  se observó una disminución en la fertilidad de la generación F1 cuando envejecían en comparación con el grupo control. Específicamente, las hembras F1 que estaban expuestas durante la gestación a BPA habían reducido la fertilidad, reducido el tamaño de la camada y reducido la capacidad de mantener el embarazo a término (es decir, índice gestacional reducido) en comparación con los controles.

En el estudio reportado por Ziv-Gal et al. [52] se expuso a la generación F0 a diferentes dosis de BPA (0.5, 20 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ) del DG 11 hasta el nacimiento. Las hembras F1 fueron usadas para engendrar a la generación F2, y las hembras F2 fueron usadas para engendrar a la generación F3. Los resultados mostraron que la exposición a BPA redujo el índice gestacional en las generaciones F1 y F2 en comparación con el control. Además, las hembras F3 mostraron una reducción de la fertilidad y disminución de la capacidad de quedar embarazadas en comparación con los controles, lo que indica un posible efecto transgeneracional del BPA en la reproducción femenina.

Por el contrario, varios estudios experimentales, informaron que la exposición a BPA no afecta los resultados de fertilidad, mencionándose algunos de estos estudios que la exposición gestacional a dosis bajas de BPA no alteró el número de camada o el tamaño de la camada en ratones y ratas [53–59].

En resumen, varios estudios indican que los niveles de BPA pueden ser más altos entre las mujeres infértiles que las mujeres fértiles y que la exposición al BPA puede reducir la fertilidad en modelos animales. Sin embargo, se necesitan más estudios para vincular hallazgos de estudios epidemiológicos y estudios experimentales.

Siendo así, la importancia del presente proyecto radica en la creciente exposición de la especie humana durante la gestación y lactancia al disruptor endócrino bisfenol-A y en los efectos negativos que podría tener este compuesto sobre la salud.

#### 3.2.1.3. Efecto de la exposición al Bisfenol A (BPA) en implantación

La exposición a BPA durante la implantación y la placentación decrementa el número de fetos y crías, y el número de crías sobrevivientes después del destete. Estas observaciones sugieren que la exposición al BPA en útero altera el desempeño reproductivo y la formación de órganos reproductivos [43].

La evidencia científica de un posible vínculo entre la exposición al BPA y los impedimentos en la implantación se basa en un estudio epidemiológico realizado por el equipo de trabajo de Ehrlich et al. [23], en el cual mostró como resultado que los niveles más altos de BPA total urinario, se asociaron con un aumento del fracaso de implantación definido por un nivel de gonadotropina coriónica beta humana ( $\beta$ -hCG) en suero  $<6$  UI/L realizado 17 días después de la recuperación del óvulo en mujeres sometidas a tratamientos de fertilización *in vitro*.

Así mismo la relación entre el BPA y la alteración de la implantación se basa en estudios experimentales en animales, tales como:

El trabajo realizado en ratones CF-1 por Berger et al. [49] donde se reportó que la exposición de animales gestantes durante el periodo de pre-implantación (DG 1-4) a dosis bajas de BPA (3.375 o 10.125 mg BPA/animal/día), redujo de forma significativa el número y el tamaño de las camadas comparado con los animales control.

En el trabajo realizado por Pan et al. [60], se utilizaron ratones hembra, a las cuales se les administró oralmente dosis 200, 400, 600 y 800 mg/kg/día de BPA, desde el día 0.5 hasta el día 3.5 de su embarazo, demostró que una alta concentración de BPA retrasó la transferencia de embriones al útero, dañó el desarrollo del blastocisto antes de la implantación e inhibió la implantación del embrión.

El estudio realizado por Berger et al. [61], donde llevo a cabo dos experimentos; en el primero, en ratones hembra inseminados recibieron vía subcutánea dosis variadas de BPA (0, 0.0005, 0.0045, 0.05, 0.125, 1.125, 3.375, 6.75 y 10.125 mg/animal/día) en los días 1-4 de la gestación; en el experimento 2, las hembras inseminadas recibieron una dosis única de BPA (0, 6.75 o 10.125 mg/animal/día) en los días 0, 1 o 2 de gestación. Los resultados obtenidos confirman que la interrupción del embarazo se debe a las acciones de BPA en los sitios de implantación, y muestran que las dosis más altas pueden influir en los niveles sistémicos de progesterona.

El estudio realizado por Berger et al. [62] donde utilizaron ratones a los cuales se les fue administrado dosis de BPA de 0, 3.375, 6.75, y 10.125 mg/animal/día en los días 1 a 4 de gestación, mostró que la exposición a BPA durante la gestación temprana actúa en el útero para interrumpir la implantación intrauterina, en consonancia con un efecto estrogénico.

El estudio realizado por Li et al. [63], utilizó ratones hembra administrados con dosis de BPA 0, 60, o 600 µg/kg/día reveló que la exposición crónica al BPA, perjudica la vía del receptor de progesterona (PGR) y afecta adversamente la implantación y el establecimiento del embarazo.

La investigación de Varayoud et al. [64], donde utilizaron ratas recién nacidas que recibieron 0.05 y 20 mg/kg/día en los días posnatales 1, 3, 5 y 7, se observó una disminución significativa en el número de sitios de implantación en las hembras expuestas a la dosis de 20 mg/kg/día al llegar a etapa adulta.

En el estudio de Xiao et al. [5], ratones hembra embarazadas fueron tratadas por vía subcutánea con dosis: 0, 0.025, 0.5, 10, 40 y 100 mg /kg /día de BPA en el intervalo de los días de gestación 0.5 al 3.5, se reportó que el tratamiento con BPA durante la preimplantación disminuyó la receptividad del endometrio a los embriones en la fase de implantación.

Todos estos estudios experimentales [5,49,60–64] que examinan los efectos de la exposición a BPA en etapas tempranas de la gestación informan un número

reducido o una ablación completa de sitios de implantación en ratones y ratas en comparación con controles. Estos estudios incluyen dosis bajas y altas de BPA.

Aunque la mayoría de los estudios indican que el BPA altera la implantación, existen dos estudios experimentales que no reportan el efecto de las dosis bajas (0, 3, 4 y 5 mg) [65] y una dosis relativamente alta (122 mg/kg/día) [66] de BPA en el número de sitios de implantación. Las razones de estos resultados discordantes no son claras, pero puede ser que los efectos de BPA en la implantación se reduzcan en altas dosis [41].

### 3.3. Implantación

La implantación es necesaria para el establecimiento del embarazo. Durante el embarazo temprano en roedores, la invasión del blastocisto en las células deciduales endometriales se acompaña de la eliminación de las CEU alrededor de los lugares de implantación. La implantación implica una serie de eventos que consiste en el acercamiento (aposisión), la adhesión y la penetración, con el paso final que implica la invasión del blastocisto en las células deciduales de endometrio, que se logra por la ruptura y eliminación de las CEU intacto en el sitio de implantación, como se ve en especies tales como humanos y roedores. En el momento de la implantación, la membrana plasmática basal adquiere cambios dinámicos, durante el cual se convierte en altamente plegada y sinuosa, y la lámina basal aumenta significativamente en espesor. Además, las adhesiones focales se pierden en este periodo [41,67–72].

La implantación del blastocisto se rige por interacciones adhesivas entre las células trofoblásticas y el epitelio endometrial receptivo. Para que la implantación sea exitosa, el endometrio experimenta cambios morfológicos y moleculares dramáticos para aceptar el blastocisto a implantar, estos cambios se conocen colectivamente como la transformación de la membrana plasmática e implican la expresión coordinada y la activación de moléculas de adhesión. Las integrinas son una de las moléculas de adhesión más estudiadas en el endometrio de humanos y de otras especies de mamíferos [73].

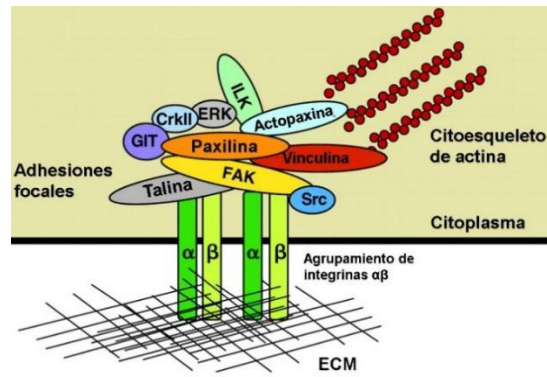
Por lo tanto, las exposiciones que interfieren con la implantación tienen el potencial de afectar la fertilidad.

### 3.3.1. Adhesiones focales

La matriz extracelular (por sus siglas en inglés, ECM) es una mezcla compleja de polisacáridos y proteínas de alto peso molecular tales como laminina, fibronectina, colágeno y vitronectina que son secretadas por las células. La ECM proporciona soporte estructural para las células y media la fijación celular. Las interacciones celulares con la ECM tienen un comportamiento crucial para una variedad de procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la homeostasis, la cicatrización de heridas y la transformación maligna [74].

Las adhesiones focales son sumamente importantes en el anclaje de células, especialmente de células epiteliales, al tejido conectivo subyacente. Las adhesiones focales están compuestas de un complejo de proteínas intracelulares estructurales y de señalización que proporcionan un vínculo entre la célula y la ECM. Estas proteínas intracelulares forman parte de la familia de receptores de superficie celular heterodiméricos conocidos como integrinas, que se unen a diferentes ligandos extracelulares, tales como: laminina, vitronectina, fibronectina y colágeno (Fig. 3) [70,73,75,76]. Las adhesiones focales no solo tienen importancia biológica estructural, sino que el montaje de las adhesiones focales tienen un comportamiento importante en la regulación de transducción de señales al citoplasma celular, mediando una amplia variedad de procesos biológicos, tales como la unión celular, la migración celular, la proliferación celular, la diferenciación y la expresión de genes [70].

La formación de la adhesión focal se inicia por el agrupamiento de receptores transmembranales: las integrinas, que se unen a la ECM y posteriormente se inicia la activación y el reclutamiento de las muchas proteínas citoplásmicas al sitio de la adhesión focal [76].



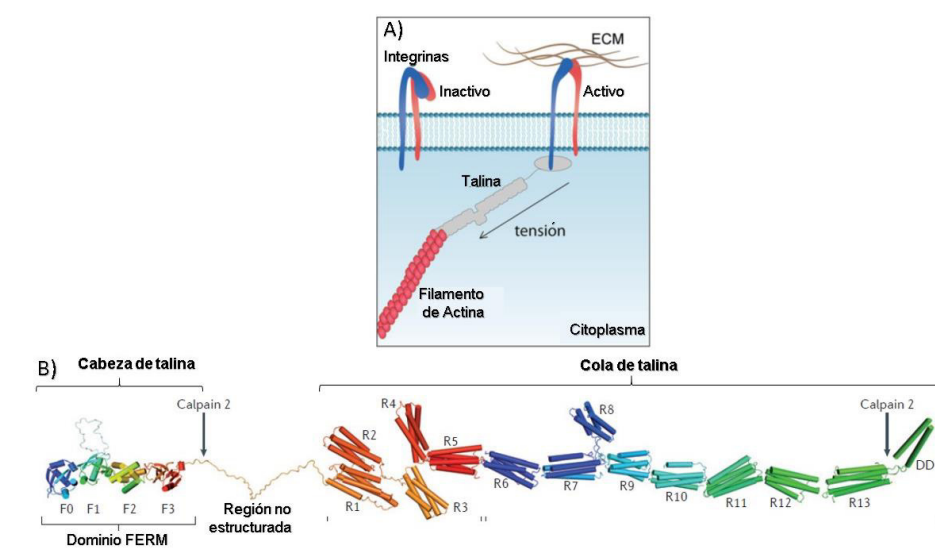
*Fig. 3 Representación del complejo de adhesión focal. Las adhesiones focales proporcionan un enlace estructural y de señalización entre el ECM y el citoesqueleto de actina. La adhesión de una célula al ECM, generada a través de los heterodímeros de las integrinas  $\alpha\beta$  transmembranales, conduce a la activación de integrinas y al reclutamiento de numerosas proteínas intracelulares a la membrana plasmática. Ahora se sabe que las adhesiones focales comprenden más de 125 especies de proteínas (solo se representan los ejemplos seleccionados), que incluyen tanto proteínas estructurales (que median un enlace físico con el citoesqueleto de actina) como proteínas reguladoras (que son importantes en la modulación de la dinámica de la actina para la migración celular productiva)[77,78] Tomado y modificado de Deakin & Turner [77].*

Las integrinas son generalmente consideradas como inactivas en su estado no unido al ligando, pero se activan y se unen tras la unión del ligando o por eventos de señalización dentro o fuera de la matriz celular, lo que resulta en un aumento de su afinidad por la ECM y el fortalecimiento de la adhesión. Esto resulta en la activación de eventos de señalización internos y externos que regulan la organización del citoesqueleto de actina, la formación de adhesiones focales, la expresión génica, y la supervivencia celular. Todas las integrinas proporcionan enlaces de la ECM al citoesqueleto de actina interno; con la excepción del heterodímero de integrina  $\alpha6\beta4$ , que está presente en los hemidesmosomas de células de la epidermis y está vinculado al sistema de filamentos intermedio interno [75].

Talina y paxilina son proteínas esenciales del complejo de adhesión focal; la inmunofluorescencia con anticuerpos contra paxilina y talina se ha convertido en un método rutinario para visualizar las adhesiones focales [70,79].

### 3.3.1.1. Talina

Talina es una proteína multidominio de gran tamaño (~270-kDa, 2541-aa) asociada a la membrana, que existe como un homodímero. Puede ser escindido por la proteasa calpaína II en dos segmentos: una "cabeza" N-terminal, que contiene un atípico dominio FERM (50 kDa) y una cola C-terminal (220 kDa). Ambos segmentos se encuentran unidos a través de una larga región no estructurada (Fig. 4 c). Talina es una proteína adaptadora grande que une a integrina, aumentando la afinidad de las integrina por la ECM y acoplando al complejo de la ECM con el citoesqueleto de actina (Fig. 4 a) [80–82].



*Fig. 4 Estructura de los dominios de talina de tamaño completo; A) Vista clásica de la función de talina, vinculando las integrinas unidas al complejo ECM con el citoesqueleto de actina. En este escenario, talina experimenta una fuerza de forma lineal en toda la molécula [82]. B) Organización de los dominios de talina: La cabeza de talina N-terminal, que comprende un dominio FERM atípico (50 kDa) que contiene dominios F0, F1, F2 y F3, unido a través de una larga región no estructurada (10 kDa) a la cola C-terminal (220 kDa) flexible de talina. La cola se compone de 62 hélices  $\alpha$  que están organizadas en trece haces de 4 o 5 hélices (R1-R13) y un solo dominio de dimerización helicoidal (DD) en el extremo carboxilo. Se marcan los sitios de unión de actina y de integrina que sirven como puntos de unión de fuerza. Modelo estructural de la talina ensamblada a partir de cristalografía y RMN de los diversos dominios. Se indican las posiciones de los sitios de escisión de la calpaína 2 [82,83]. Tomado y modificado de Calderwood et al. [83] y YAN et al. [82].*



El dominio globular (cabeza N-terminal) o dominio FERM de talina es rico en aminoácidos básicos que pueden interactuar con los grupos cargados negativamente. La función más importante de la cabeza de talina se relaciona con la unión a las colas citoplasmáticas de la integrina  $\beta 1$  y  $\beta 3$ , lo cual lleva a la activación de las integrinas de superficie de membrana, así como con la unión con los fosfolípidos de membrana como PIP2 y la de cinasa de adhesión focal (por sus siglas en inglés, FAK). El dominio de varilla alargada (cola C-terminal) se une a las proteínas vinculina y actina; contiene un segundo sitio de unión a la integrina, proporcionando así un vínculo entre integrinas y el citoesqueleto de actina [80–82,84,85].

Debido a que la talina se recluta a las adhesiones focales de forma temprana, se ha sugerido que la talina desempeña una función de andamiaje en el reclutamiento de las moléculas de las adhesiones focales y enzimas [86].

La unión de la actina con la cola C-terminal de la talina, y la unión del dominio citoplasmático de la subunidad beta de la integrina a la cabeza N-terminal de la talina, proporciona una conexión entre el citoesqueleto de actina y la ECM. Es una conexión en la cual la talina sirve como enlace que da soporte mecánico; proporcionando así un enlace actina-membrana. En este escenario, talina experimenta una fuerza lineal en toda la molécula (Fig. 4 a) [70,76,79,81,82].

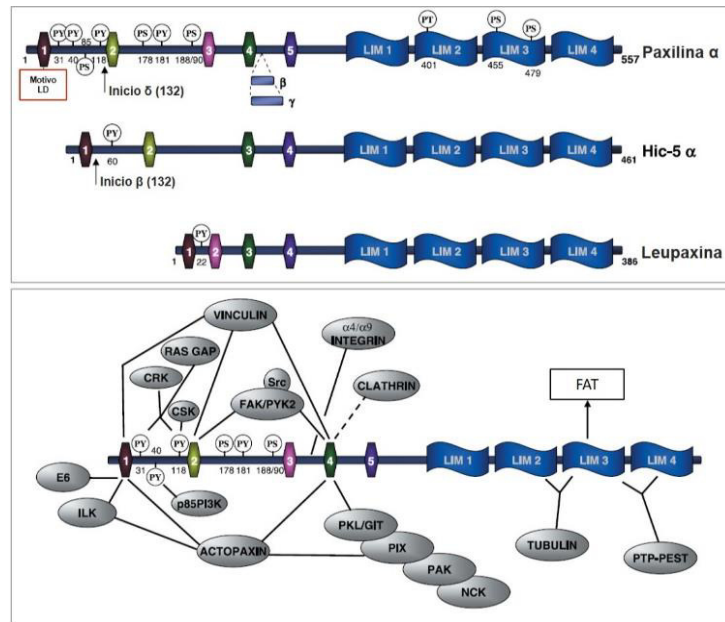
#### 3.3.1.2. Paxilina

Paxilina (68 kDa) es una proteína adaptadora molecular involucrada en el reclutamiento de múltiples proteínas del citoesqueleto y proteínas de señalización al complejo de adhesión focal y, a su vez, ofrece sitios de acoplamiento molecular para estas proteínas [75,79,87]. Una función principal de la paxilina es la integración y diseminación de las señales de las integrinas y los receptores del factor de crecimiento para efectuar la migración celular eficiente a través del reclutamiento y activación de una variedad de redes de señalización [75,87,88]. La unión de la integrina a la ECM promueve la fosforilación de paxilina y el reclutamiento de proteínas implicadas en el ensamblaje de las adhesiones focales, incluyendo talina, vinculina, tensina y la FAK. La fosforilación de Tyr de la paxilina proporciona un

andamio para el reclutamiento de cinasas de tirosina FAK y Src, que se activan como resultado de la adhesión o la estimulación de factor de crecimiento. La unión de la integrina a ECM da como resultado la fosforilación Tyr de la paxilina y de la FAK, la formación de adhesiones focales y el ensamblaje de las fibras de actina necesarias para fortalecer y estabilizar la interacción celular con la ECM [88].

Como una proteína de andamiaje, la paxilina contribuye al reclutamiento de quinasas y fosfatasas específicas, cofactores, oncoproteínas y proteínas estructurales, involucradas en cascadas de señalización intracelular. La activación de estas vías conduce en última instancia a la reorganización del citoesqueleto de actina, y el ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales requeridas para la unión, la extensión y la migración de la célula [88]. Aunque la paxilina está localizada principalmente en las adhesiones focales, también está presente en localizaciones citoplasmáticas y nucleares, donde puede afectar la transcripción de genes, actuando así como un enlace directo desde la membrana plasmática y el citoesqueleto hasta el núcleo [89]. A pesar de su inclusión en complejos de proteínas con proteínas citoesqueléticas y enzimas, la paxilina no exhibe actividad enzimática pero proporciona sitios de acoplamiento para otras proteínas para facilitar el ensamblaje de complejos multiproteicos [88].

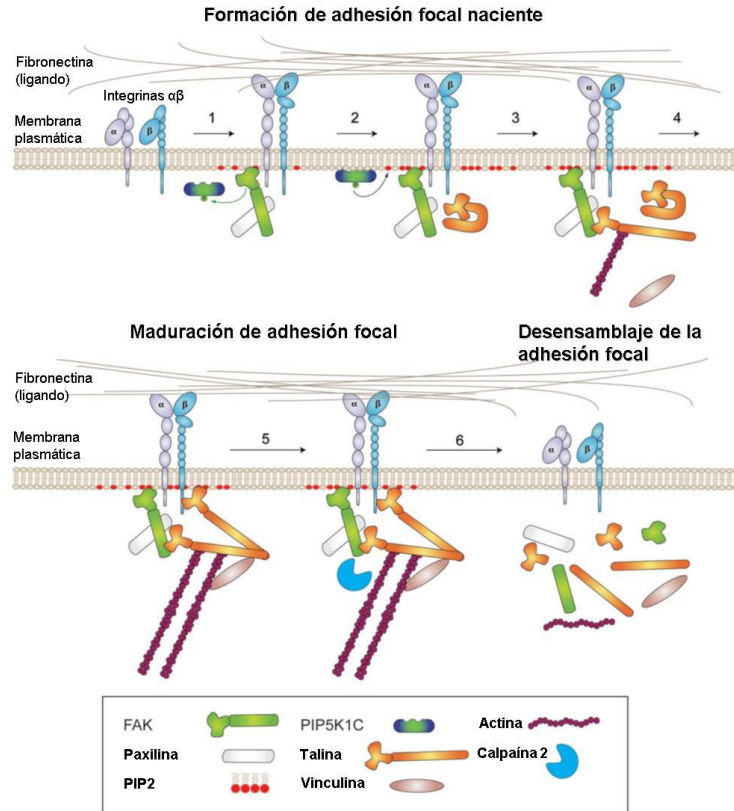
La paxilina forma parte de una superfamilia más grande que consiste en paxilina  $\alpha$ , paxilina  $\beta$ , paxilina  $\gamma$  y paxilina  $\delta$ , y los homólogos Hic-5 y Leupaxina. La paxilina  $\alpha$  es la isoforma principal, ubicuamente expresada, mientras que las isoformas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  presentan una expresión restringida [75,87,88].



*Fig. 5 Dominios de Paxilina y sitios de interacción. Parte superior: Estructura de dominio de los miembros de la familia de la paxilina. La paxilina  $\alpha$  es una proteína de 68 kDa de 557 aminoácidos (humana) que está formada por múltiples dominios estructurales que incluyen 5 motivos de LD ricos en leucina (consenso LDXLLXXL) (274) y 4 dominios dobles de LIM de dedo de cinc. Estos dominios están implicados en múltiples interacciones proteína-proteína. Los dominios LIM también son necesarios para dirigir la paxilina a las adhesiones focales. Se han identificado dos variantes de empalme de paxilina ( $\beta$  y  $\gamma$ ) con una distribución más restringida. Una cuarta isoforma, la paxilina  $\delta$ , está enriquecida en tipos de células epiteliales y se cree que se genera a partir de un sitio de inicio de traducción alternativo interno. Parte inferior: socios vinculantes de paxilina. La paxilina está compuesta de múltiples motivos de unión a proteínas, incluyendo los motivos LD amino-terminales, los dominios LIM carboxi-terminales y varios sitios de acoplamiento de dominio fosfotirosina-SH2. Tomado y modificado de Brown & Turner [87].*

### 3.3.1.3. Mecanismo de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales

A continuación, se describen los pasos simplificados en el ensamblaje y el desensamblaje de las adhesiones focales, una de las vías sugeridas (Fig. 6) [80,81,83–85,90–92].



*Fig. 6 Modelo de un enlace jerárquico de proteínas de adhesión focal y el control de la motilidad celular. Tomado y modificado de Lawson & Schlaepfer [84].*

(1) La adhesión de las integrinas a los ligandos de la ECM, tales como la fibronectina, estimula la síntesis de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato PIP2 [80] y el reclutamiento de proteínas de adhesión focal, tales como talina, vinculina, paxilina, FAK, y PIP5K1C a adhesiones focales nacientes [84,90,91]. La síntesis de PIP2 se produce a través de la fosforilación secuencial de PIP por PIP5K1C y resulta en el incremento de niveles de PIP2 en las adhesiones focales nacientes [80,90]. La presencia de PIP2 promueve la asociación de talina-integrina mediante el aumento de la afinidad de talina para la subunidad de la integrina  $\beta 1$  [80,85]. El PIP2 se asocia transitoriamente con talina, casi en paralelo con la acumulación de PIP2 estimulada por la adhesión a la subunidad  $\beta 1$  [80].

(2) PIP2 en las adhesiones focales se une a FAK a través de una unión básica en el dominio FERM de FAK, dando lugar en la agrupación de FAK en la membrana celular [90]. El dominio de orientación a la adhesión local (por sus siglas en inglés,

FAT) que contiene FAK, está implicado en la localización de FAK a sitios de adhesión focal, y el dominio FERM que contiene FAK, ejerce su comportamiento como un autoinhibidor del dominio cinasa, regulando así la actividad catalítica de la proteína [90,92]. El dominio FAT contiene sitios de unión para las proteínas de adhesión focal paxilina y talina, que conjuntamente parecen mediar en la orientación a la adhesión local [93,94]. El dominio C-terminal de FAT media este reclutamiento por asociación con paxilina a través de dos sitios de unión para los motivos LD de paxilina, formados por hélices H1/H4 y H2/H3 en lados opuestos de la molécula. FAT también interactúa con talina, y puede contribuir al reclutamiento de cualquiera de los participantes de las adhesiones focales [91]. La activación de FAK en las adhesiones nacientes, aumenta la generación de PIP2 por la fosforilación de PIP5K1C por FAK [80,84]. El agrupamiento de FAK inducido por PIP2 produce una conformación relajada del dominio FERM/cinasa de FAK [90], lo cual permite la autofosforilación eficiente de Y397 y el reclutamiento de Src a través de los dominios SH2 y SH3. El Src reclutado fosforila los residuos del bucle de activación. Y576/Y577 de FAK, que da como resultado la completa activación y la liberación del dominio cinasa del dominio FERM [90,92].

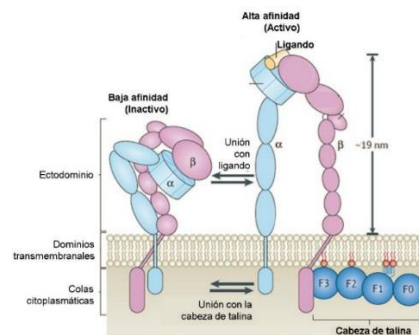


*Fig. 7 Organización de los dominios de FAK incluyendo sitios de fosforilación. FAK es una proteína multidominio de 120 kDa que contiene un dominio FERM, seguido por un enlace de 50 residuos, un dominio de cinasa central, una región de ~220 residuos rica en prolina de baja complejidad y un dominio C-terminal FAT [90,95]. Tomado y modificado de Zhou et al. [92].*

PIP2 puede unirse al dominio de FERM de talina y permite un cambio conformacional en talina [80,84], aumentando su afinidad por la cola citoplasmática de la integrina [80], que promueve la unión del dominio FERM de talina a la FAK y el reclutamiento por talina de adhesiones nacientes [84]. Esta interacción, además de otras interacciones de la proteína de adhesión influenciadas por PIP2, puede facilitar así el montaje de las adhesiones mediante la regulación de la unión inicial de la integrina [80]. Curiosamente, la PIP5K1C y la subunidad citoplasmática de integrina  $\beta 1$  se unen al mismo dominio FERM de la talina. El subdominio F3 en el

dominio de la cabeza de talina activa las integrinas, y la PIP5K1C se une al subdominio F2-F3, cubriendo parcialmente el sitio de unión a la integrina. Esta unión es competitiva, como se muestra por la inhibición de la unión de la integrina  $\beta 1$  por un péptido PIP2 [80].

(3) La dimerización de talina permite la unión directa del dominio FERM de talina a la FAK y a la integrina  $\beta 1$  para señalización de adhesión sostenida (Lawson & Schlaepfer, 2012). La unidad F3 del dominio FERM de talina se une a la cola citoplásmica de las integrinas  $\beta$  en el motivo "NPxY" y da como resultado una mayor afinidad de la integrina a su ligando de la ECM en un proceso denominado señalización de dentro de la célula hacia afuera (Fig. 8). La señalización de dentro hacia afuera y la subsiguiente extensión del ectodominio de las integrinas, aumenta la afinidad de las integrinas por su ligando, pero sólo transitoriamente, causando separación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de integrina. Esta actividad permite que la talina regule la actividad de unión de las integrinas a la ECM [81,85,94,96,97].



*Fig. 8 Estructura de integrina y activación de Integrina por medio de talina. Tomado y modificado de Calderwood et al. [83].*

La unión de la actina con la cola C-terminal de la talina, y la unión del dominio citoplasmático de la subunidad beta de la integrina a la cabeza N-terminal de la talina proporciona una conexión entre el citoesqueleto y la ECM a lo largo de la varilla de la talina. Es una conexión en la cual la talina sirve como enlace que da soporte mecánico; proporcionando así un enlace actina-membrana. En este escenario, talina experimenta una fuerza lineal en toda la molécula (Fig. 4 a) [70,76,79,81,82].

(4) La presencia de vinculina asiste en el proceso de estabilización de la adhesión focal, que es mediada a través de su interacción con talina y actina. La vinculina también sirve para activar otras regiones de la cola C-terminal de talina, como el segundo sitio de unión a actina localizado en la parte central de la cola de talina, por medio de la cual la adhesión se estabiliza. Sin la aplicación de la fuerza, que estabiliza el eje ECM-integrina-talina-actina en un proceso denominado de afuera hacia adentro de la célula de señalización, la integrina puede volver a un estado de baja afinidad. Los ligandos ECM anclados inducen cambios alostéricos en las conformaciones de integrina, lo que conduce al fortalecimiento del estado de alta afinidad y propagación como una señal mecánica, que puede conducir a una señalización más abajo [81,83,84]. Como un puente crucial entre las integrinas y el citoesqueleto, la talina ha sido implicada en el desensamblaje señalizado de afuera hacia adentro mediada por estrés de la adherencia de  $\alpha 4\beta 1$  y LFA-1. Una imagen de la afinidad de la integrina es, por tanto, incompleta sin la consideración de la señalización de afuera hacia adentro. Esto demuestra además la importancia del microambiente físico en la modulación de la función celular [81].

(5) La unión de una proteasa tal como calpaína 2 a FAK facilita un complejo multi-proteína en las adhesiones [84].

(6) La escisión mediada por calpaína 2 de talina en los fragmentos cabeza y cola mediada por calpaína 2 y realizada por FAK facilita el desensamblaje de la adhesión requerida para un movimiento celular eficiente [84].

#### 3.3.1.4. Adhesiones focales en el útero de rata durante el embarazo temprano

Las proteínas de adhesión focal, adquieren cambios dinámicos de distribución en CEU de rata durante el embarazo temprano; siendo así se describirán cómo se observan en un estado normal (sin algún factor que modifique su expresión) específicamente la expresión de las proteínas talina y paxilina a lo largo de las CEU a diferentes días de gestación por medio de inmunohistoquímica.

El día 1 de gestación es el día posterior al apareamiento (tiempo de fertilización); con estudios que utilizaron inmunohistoquímica, se localizaron específicamente las

proteínas talina, paxilina, integrina  $\beta 1$  y la integrina  $\beta 3$  a lo largo de la membrana plasmática basal de las CEU, lo cual indica la formación de adhesiones focales en la membrana basal durante este día [70,73,76,79,98]. Los trabajos de Kaneko et al. [70,76], muestran la expresión lateral de paxilina, y otro artículo de este autor [73] muestra la expresión lateral y apical de talina. Así mismo Kaneko et al. [70,76] y Lindsay et al. [98] describen que hay tinción citoplasmática difusa de talina y paxilina en las CEU. Estudios ultraestructurales previos han demostrado que las CEU en el DG1 presentan engrosamientos de la membrana plasmática basal y la lámina basal, presentándose estructuras electro-densas, las cuales fueron identificadas como adhesiones focales. Sin embargo, al momento de la implantación, la membrana plasmática basal adquiere cambios dinámicos haciéndose más plegada y sinuosa, y la lámina basal incrementa su grosor y se pierden las adhesiones focales [99,100].

En el día 3 de gestación (el cual es el periodo de preimplantación), la tinción de las proteínas talina y paxilina se sigue manteniendo a lo largo de la membrana plasmática basal de las CEU. Sin embargo, se observa una disminución en la intensidad de la tinción en comparación con el día 1 de gestación. Así mismo, para las dos proteínas se muestra tinción citoplasmática difusa [98]. En el trabajo de Murphy [100] en el día 3 del embarazo, se observó que quedaba cierta densidad citoplasmática, se había vuelto difícil discernir claramente esta región.

En el día 6 del embarazo, cuando el útero es receptivo para la implantación (que se define como la adhesión irreversible del blastocisto a las CEU), se han producido cambios importantes en las proteínas, talina, paxilina, integrina  $\beta 1$  e integrina  $\beta 3$ ; las cuales se desmontan del sitio de las adhesiones focales, lo que conduce a una marcada reducción de estas proteínas en la superficie basal de las CEU [70,73,76,101] el grupo de trabajo Lindsay, et al. [98] menciona que hay tinción basal y tinción citoplasmática difusa para proteínas talina y paxilinas, mostrándose menos intensa para la proteína paxilina. Se ha detectado que durante el DG 6, en la rata [73], la expresión de la integrina  $\beta 3$  se incrementa significativamente a lo largo de la membrana plasmática apical, lo cual sugiere un efecto importante de esta integrina para la adhesión del blastocisto al epitelio uterino. Esto mismo se ha



detectado en otras especies: en el ratón [102], borrego [103] y cerdo [104]. En el humano, se incrementa la expresión de integrina  $\beta 1$  en el momento de la implantación [105], la integrina  $\beta 3$  se detecta en las glándulas endometriales humanas en el día 20 del ciclo menstrual, coincidiendo con el tiempo de implantación [106,107]. Anormalidades con la expresión de integrinas se han relacionado con infertilidad inexplicable [106,108,109] y endometriosis [109–111].

Con los resultados obtenidos en sus trabajos el autor Kaneko et al. [70,73,101] sugirió que este desmontaje de adhesión focal permite que las CEU se hagan menos adherentes a la lámina basal subyacente, facilitando así su desprendimiento y permitiendo que el blastocisto invasor penetre en las células deciduales subyacentes para la formación placentaria. Esta pérdida de proteínas de adhesión focal es controlada por la progesterona y se limita a las CEU, porque la paxilina y la talina en las células epiteliales glandulares permanecen inalteradas durante el embarazo y en respuesta al tratamiento hormonal de ratas ovariectomizadas; por lo que sólo las CEU reestructuran la membrana plasmática durante el embarazo temprano, ya que sólo ellas hacen el primer contacto con el blastocisto [70,79].

Después de la adhesión del blastocisto se presenta la penetración del blastocisto en el útero (día 7 de gestación en la rata). Las CEU en contacto con el blastocisto se separan de la lámina basal subyacente y facilitan la invasión del blastocisto para establecer la placenta [76]; Durante este día, aumenta la expresión en la superficie basal y citoplasmática difusa de talina y paxilina en las CEU, aumentando más talina en la región basal [98].

#### 3.3.1.5. Efecto del BPA sobre la expresión de las proteínas de adhesión focal

El único trabajo que se ha realizado en el que se estudia el efecto que tiene el BPA sobre la expresión de proteínas de las adhesiones focales fue el realizado por Pan et al. [112] en donde se estudió la expresión de la integrina  $\beta 3$  en el útero de ratones tratados con BPA del DG 0.5 al DG 4.5. En los grupos tratados con dosis alta (400 o 600 mg/kg/día BPA) se observó una disminución en la expresión de la integrina  $\beta 3$  en las CEU en el DG 5, así como en el blastocisto en este mismo día que

correlacionó con una disminución significativa en el número de sitios de implantación. Estos resultados indican que el tratamiento con dosis altas de BPA puede reducir significativamente la implantación del blastocisto en el endometrio.

A pesar de que se ha realizado este estudio, aun no se sabe cuál es el efecto de dosis bajas de BPA, semejantes a las que estamos expuestos los seres humanos, ni el efecto que tiene cuando la exposición se realiza en etapa perinatal.

#### **4. Planteamiento del problema**

El BPA es un producto químico de alto volumen de producción utilizado en una variedad de productos de consumo común. Más notablemente, está presente en plásticos de policarbonato, en los revestimientos de resina epoxi de latas de aluminio, y recipientes térmicos, entre otros productos. Se ha demostrado, tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro*, que el BPA actúa como disruptor endocrino (que interrumpe las acciones normales de hormonas endógenas), y que estamos expuestos diariamente a este compuesto.

La implantación es necesaria para el establecimiento del embarazo; en el momento de la implantación, las proteínas de adhesiones focales, talina y paxilina, modifican su expresión para permitir la invasión del blastocisto. Por lo tanto, las exposiciones que interfieren con la implantación tienen el potencial de afectar la fertilidad ya que el período entre la fertilización y la implantación intrauterina de óvulos fertilizados es altamente sensible a las fluctuaciones en los estrógenos naturales.

Aunque se requiere más investigación, actualmente existen evidencias suficientes para plantear preocupación y justificar la práctica del principio de precaución, en particular para la protección del feto en desarrollo, recién nacidos y niños pequeños, ya que pueden ser los más vulnerables a los efectos adversos del BPA.

Es evidente que se necesitan más investigaciones básicas y clínicas para comprender el mecanismo de acción del BPA y el posible impacto del BPA en la salud humana. Por lo que, en este trabajo se busca estudiar el efecto de dos dosis del disruptor endocrino BPA sobre las proteínas de adhesiones focales, paxilina y talina, que podrían estar involucrados en el control de la implantación en las crías

de ratas, las cuales recibieron el compuesto en útero y durante la lactancia a través de su madre.

El obtener resultados de este trabajo, contribuirá al desarrollo de investigaciones de utilidad social, en este caso como mostrar a la sociedad los efectos dañinos de los disruptores endocrinos, como el BPA, ya que la investigación científica ha logrado relacionar a los disruptores endocrinos con un amplio número de enfermedades en la salud reproductiva femenina como son: pubertad precoz, cáncer de mama, disminución de la fecundidad/fertilidad y también con un gran número de enfermedades en la salud reproductiva masculina como son: malformaciones en genitales de bebés, disminución de calidad de semen, cáncer de testículo y de próstata.

Crear conciencia sobre estos males reproductivos es de suma importancia y utilidad para la sociedad, puesto que este disruptor endocrino, el BPA, se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente y el ser humano está constantemente expuesto a este compuesto.

## **5. Hipótesis**

Es necesario que haya una remodelación adecuada de la membrana plasmática del epitelio uterino para que se lleve a cabo una implantación adecuada, en la cual están las proteínas de adhesión focal. Se espera que en la generación F1 de ratas, las cuales recibieron dosis diferentes de BPA durante el periodo de la gestación y la lactancia a través de su madre (F0), presenten un cambio en la expresión y/o la localización de las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, respecto a los animales control.

## **6. Objetivo**

Estudiar el efecto del disruptor endocrino BPA a diferentes dosis (0.05 mg/kg/día y 20 mg/kg/día) sobre mecanismos moleculares (proteínas de adhesiones focales) que podrían estar involucrados en el control de la implantación en la generación F1 de ratas, las cuales recibieron el compuesto durante el periodo de la gestación y la lactancia a través de su madre (F0).

### 6.1. Objetivos particulares

Evaluar la expresión y localización de las proteínas de adhesiones focales, paxilina, talina, en el endometrio por inmunohistoquímica en los animales tratados con BPA (dosis alta y baja) y controles de las generaciones F1 en los días 1, 3, 6 y 7 de la gestación.

## 7. Metodología

### 7.1. Animales de experimentación

El mantenimiento y manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo con las Directrices de la Ley Mexicana de Protección Animal y con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM. Se utilizaron ratas hembras adultas gestantes (F0) de la cepa Wistar, obtenidas del centro de animales UNAM-Harlan, mantenidas bajo ciclos de luz/oscuridad 12 hr:12 hr, con comida *ad libitum*.

#### 7.1.1. Dosis de Bisfenol A (BPA) para la realización de este trabajo

Sobre la base de una estimación de la Agencia de los Estados Unidos de Protección Ambiental (por sus siglas en inglés, EPA EE.UU.), la dosis con el nivel de efecto más bajo adverso observado (por sus siglas en inglés, LOAEL) para la exposición oral al BPA en ratas es de 50 mg/kg/d. Expertos del Programa Nacional de Toxicología (por sus siglas en inglés, NTP EE.UU.) sugirieron una dosis de corte de 5 mg de BPA/Kg/día para la clasificación de los efectos de dosis baja, independientemente de la vía de administración, duración de la exposición, o la edad/etapa de la vida a la que ocurre la exposición. Contemplando los conceptos mencionados anteriormente, la dosis alta de BPA utilizada en este trabajo (20 mg/kg/día) es cuatro veces mayor que la dosis baja de corte sugerida por el grupo de expertos del "National Toxicology Program (NTP)", y 2.5 veces menor que la LOAEL estimada por la EPA. Mientras tanto, la dosis baja es 100 veces menor (0.05 mg/kg/día) que la dosis baja de corte sugerida por el grupo de expertos del NTP, y es similar a la "dosis segura" o nivel de ingesta diaria admisible (IDA) establecida por la EPA de EE.UU [64].

Se probaron 2 dosis diferentes de BPA: (Grupo 1) 200 mg/L y (Grupo 2) 0.5 mg/L. Se estima que los niveles de BPA consumidos diariamente por las hembras gestantes sea aproximadamente de 20 mg/kg peso corporal/día (dosis alta) ó 0.05 mg/kg peso corporal/día (dosis baja).

### 7.2. Tratamiento de animales

La vía principal de BPA en el cuerpo humano es la administración oral, por lo tanto, en este estudio, se analizaron los efectos de BPA administrado en dos dosis en el desarrollo de la implantación.

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.

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. 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.

A partir del día 6 de la gestación y durante el periodo de lactancia (21 días), se suministró diariamente a ratas hembras adultas (F0) de la cepa Wistar obtenidas del centro de animales UNAM-Harlan, vía oral BPA (Sigma Aldrich) diluido en etanol (vehículo) al 0.1%, y disuelto en agua. La solución fue suministrada en bebederos de vidrio para evitar que compuestos provenientes de botellas de plástico que contengan policarbonato interfieran en los resultados de este estudio, el grupo 1

dosis baja de BPA (BPA-L) recibió 0.05 mg/kg/día, el grupo 2 dosis alta de BPA (BPA-H) recibió 20 mg/kg/día. Los animales control (Grupo 3) recibieron solamente agua con etanol (vehículo) al 0.1%. Los animales utilizados para cada tratamiento fueron 5. Se mantuvo a una hembra por caja y se monitoreó a partir del día 20 para vigilar la fecha de nacimiento.

El día del parto se registró el número de crías y se ajustaron a 10 crías por madre (F0). Las crías (F1) permanecieron con las madres (F0) durante la lactancia y fueron destetadas al día 21 postnatal, después de este día las crías F1 fueron administradas con agua potable no adulterada. La ciclicidad de las hembras F1 se determinó a los 3 meses de edad mediante frotis vaginales diarios durante 4 semanas consecutivas. Las hembras fueron apareadas con ratas Wistar macho con probada fertilidad, comenzando a las 16:00 h del día proestro. El apareamiento fue confirmado por la presencia de espermatozoides en un frotis vaginal la mañana siguiente, este día fue designado día de gestación 1 (DG 1) y se evaluó la proporción de la descendencia entre hembras F1 y machos.

Se sacrificaron grupos de cinco hembras F1 en los días de gestación (DG) 1, 3, 6 y 7. En cada DG, se utilizaron animales de diferentes camadas para evitar posibles efectos de camada.

### 7.3. Preparación de tejidos para microscopía de Inmunofluorescencia

Se anestesiaron los animales de cada grupo y se sacrificaron en la mañana de los días 1, 3, 6 y 7 de la gestación (5 por día por grupo). Se extrajeron ambos cuernos uterinos y fueron cortados en fragmentos pequeños de 5 mm de longitud e inmediatamente embebidos en OCT (Tissue Tek; SakuraFinetek, Torrance, CA, USA), enfriados rápidamente en hexano superenfriado (Sigma-Aldrich) y guardados a -70 °C hasta que fueron procesados.

### 7.4. Inmunofluorescencia

Se realizaron cortes del tejido congelado de 8 µm de grosor en un criostato y fueron montados en laminillas cargadas con poly-L-lisina.

Los cortes se fijaron con acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, se realizó 1 lavado con amortiguador de fosfatos (por sus siglas en inglés, PBS) por 5 minutos, y fueron puestos a permeabilizar por 10 minutos en 0.5% de tritón X-100. Se lavaron nuevamente los cortes con PBS tres veces, cada una de 10 minutos y fueron puestos a bloquear por 30 min con 0.5% albúmina de suero bovino libre de IgG. Se incubaron los cortes toda la noche con los siguientes anticuerpos: anti-talina (Dilución 1:50  $\mu\text{L}$  Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y anti-paxilina (Dilución 1:50  $\mu\text{L}$ ; Santa Cruz Biotechnology) a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Después del periodo de incubación, los cortes fueron lavados 3 veces con PBS e incubados por 2 h con un anticuerpo secundario adecuado acoplado a FITC. Para el control negativo, se omitió el anticuerpo primario.

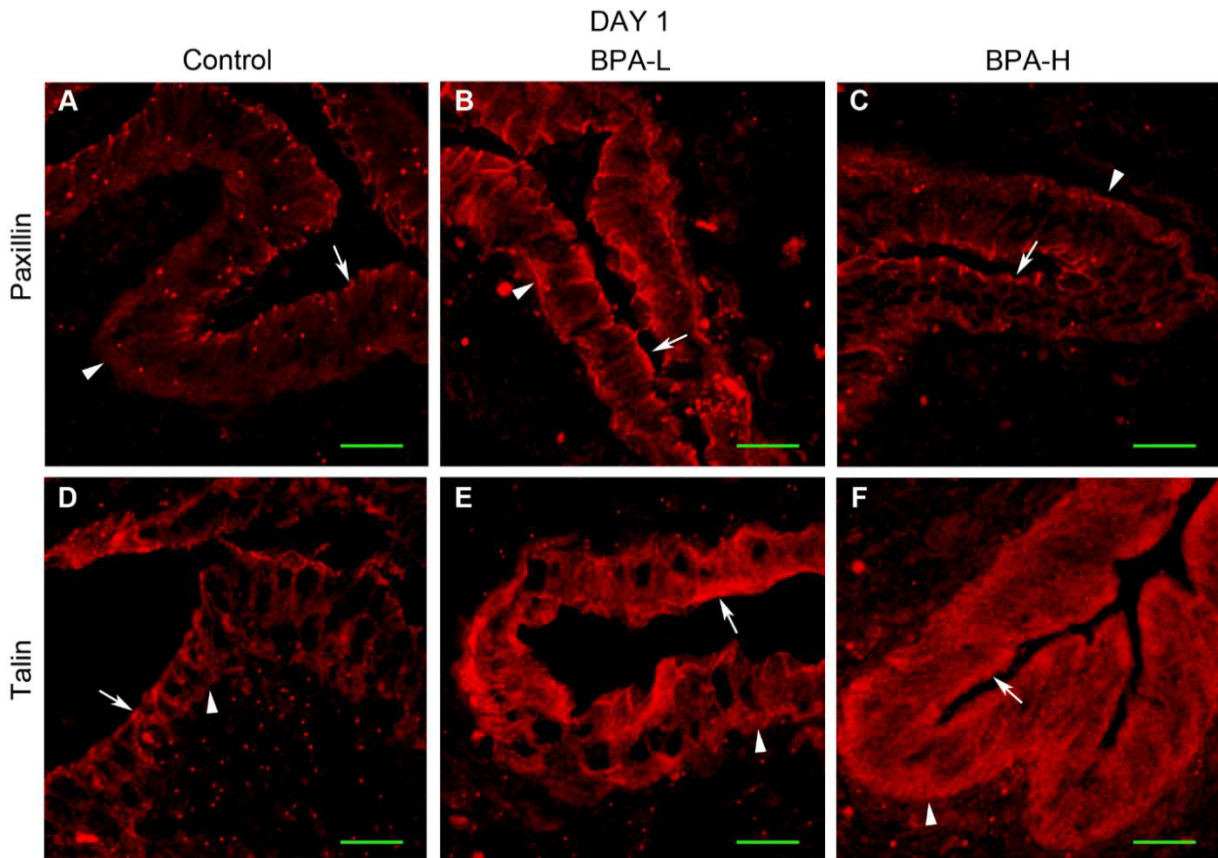
Después de cuatro lavados, las secciones se montaron con medio de montaje Fluoroshield with DAPI (Sigma).

La fluorescencia fue examinada con un microscopio confocal. Se realizaron secciones ópticas de  $0.5\ \mu\text{m}$ , y las imágenes representan la proyección de cada corte realizado para cada útero.

## **8. Resultados**

En las siguientes figuras: Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11 y Fig. 12, se muestran las 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 las proteínas paxilina y talina en los tres grupos.

### 8.1. Día 1 de gestación



*Fig. 9 Expresión de talina y paxilina en útero de rata en el día 1 de gestación.* Control: grupo sin tratamiento. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. Las flechas señalan la presencia de la proteína en la parte apical del epitelio luminal y las puntas de flecha su localización en la parte basal. Barra de escala = 20  $\mu$ m.

El DG 1 corresponde al día siguiente al apareamiento. En este día (Fig. 9 y Tabla 1) la proteína paxilina se localizó a lo largo de las regiones basal (punta de flecha) y apical (flecha) de las CEU, en todos los grupos tratados. Sin embargo, los tratamientos con BPA mostraron una mayor tinción en la región apical (flecha) que la tinción expresada en el grupo control, siendo la dosis baja (BPA-L) en la que se observó una tinción más intensa en la región apical (Fig. 9 B y Tabla 1).

En cuanto a la región basal (punta de flecha) el grupo BPA-L (Fig. 9 B) mostró mayor tinción con respecto al control (Fig. 9 A) y al BPA-H (Fig. 9 C y Tabla 1).

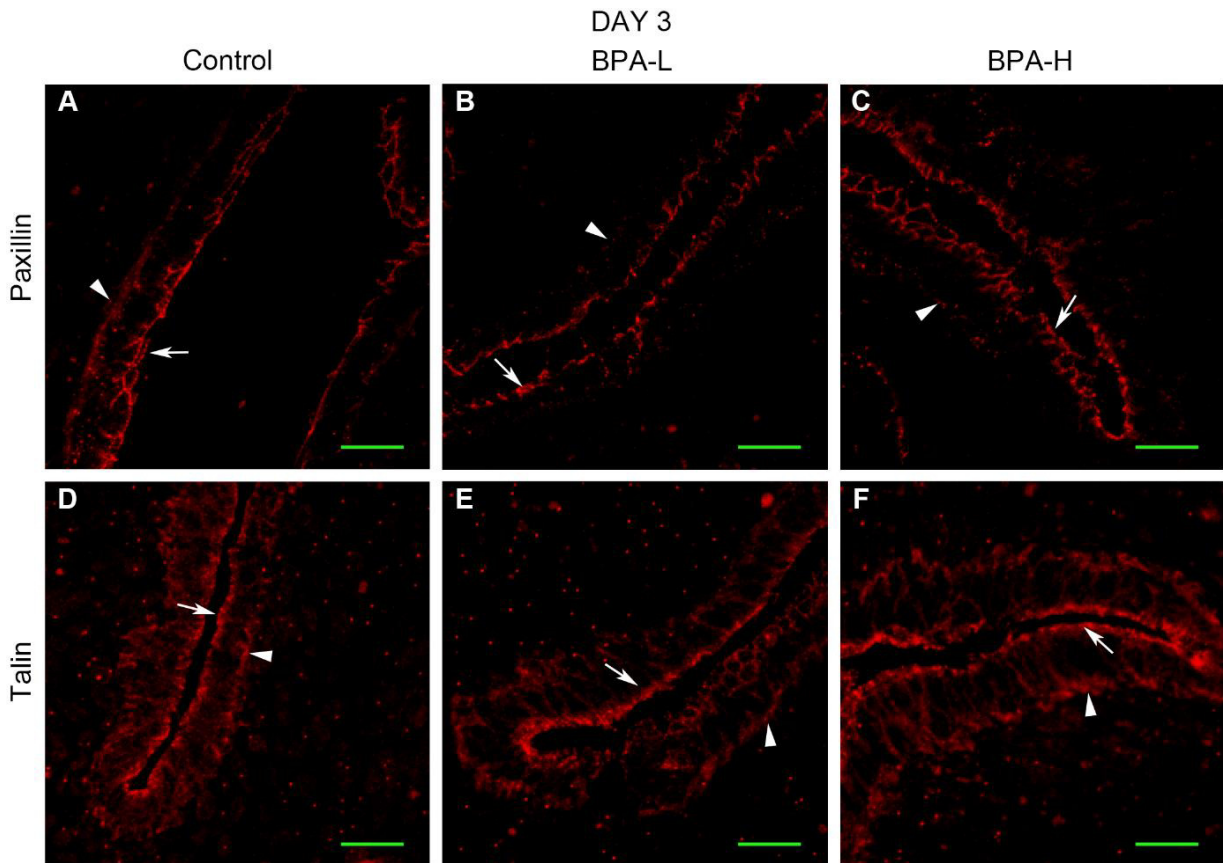


En todos los grupos se mostró tinción lateral pero la tinción fue más intensa en el grupo BPA-L (Fig. 9 B y Tabla 1).

Durante este mismo día (Fig. 9 y Tabla 1), la proteína talina se detectó tanto en la región basal (punta de flecha) como en la apical (flecha) de las CEU en los tres grupos, pero particularmente se observó mayor tinción en ambos sitios (basal y apical) de los dos grupos tratados con BPA en comparación con el grupo control. Además, el grupo control (Fig. 9 D) fue el único que presentó tinción lateral. En contraste, en ambos tratamientos con BPA (BPA-L: Fig. 9 E y BPA-H: Fig. 9 F) se observó una tinción citoplasmática difusa, mientras que ésta no se presentó en el grupo control.

Estos resultados sugieren que los tratamientos con BPA inducen un incremento en la expresión de ambas proteínas. El incremento en la expresión de ambas proteínas en la membrana basal de las CEU podría indicar un incremento en la formación de adhesiones focales en la membrana basal, la cual es necesaria en esta etapa para mantener una barrera epitelial íntegra en el útero.

## 8.2. Día 3 de gestación



*Fig. 10* Expresión de talina y paxilina en útero de rata en el día 3 de gestación. Control: grupo sin tratamiento. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. Las flechas señalan la presencia de la proteína en la parte apical del epitelio luminal y las puntas de flecha su localización en la parte basal. Barra de escala = 20  $\mu$ m.

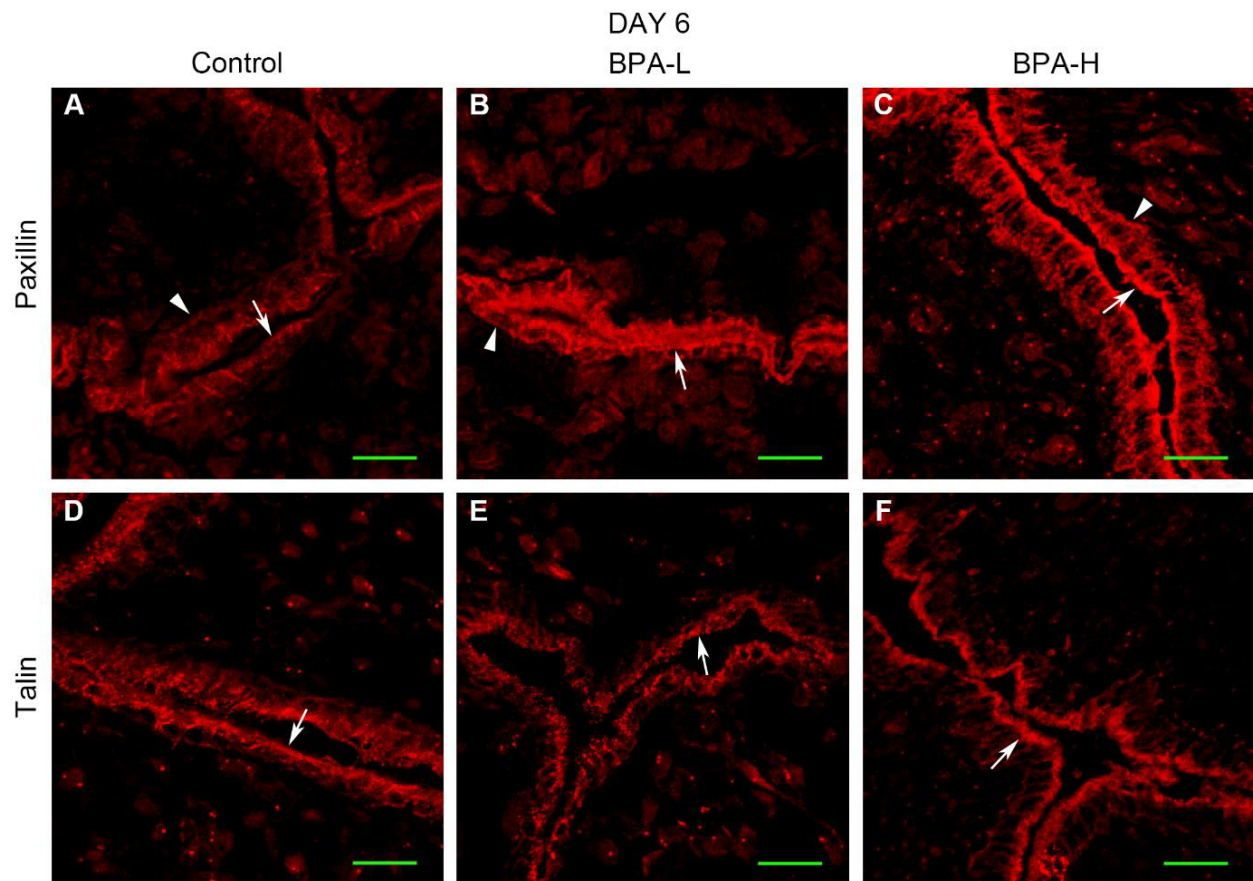
En el día 3 de gestación (Fig. 10 y Tabla 1), la tinción de paxilina en la región basal (punta de flecha) y apical (flecha) aumentó con respecto en el grupo control del día anterior (Fig. 9 A). Sin embargo, la tinción de esta proteína se redujo en los grupos BPA-L (Fig. 10 B) y BPA-H (Fig. 10 C) con respecto al día anterior con sus respectivos tratamientos (Fig. 9 B-C). Se mantuvo la tinción en la región lateral en todos los tratamientos, mostrando una tinción similar.

En el caso de la talina, la tinción fue similar a lo largo de la región basal (punta de flecha) y apical (flecha) de las CEU en el grupo control de DG3 (Fig. 10 D) pero

disminuyó la expresión en la región apical (flecha) en los tratamiento con BPA (Fig. 10 E-F) con respecto al grupos respectivos del día anterior (Fig. 9 E-F). Ambos grupos tratados con BPA (Fig. 10 E-F) mostraron la localización de esta proteína en la membrana lateral de las CEU, mientras que el grupo control presentó una tinción citoplasmática difusa en este día (Fig. 10 D).

Estos resultados señalan que los tratamientos no generan un cambio en la expresión de ambas proteínas en el DG3, observándose igual que el control para cada una de ellas.

### 8.3. Día 6 de gestación



*Fig. 11 Expresión de talina y paxilina en útero de rata en el día 6 de gestación. Control: grupo sin tratamiento. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. Barra de escala = 20  $\mu$ m.*

En el momento de la implantación, DG 6 (Fig. 11 y Tabla 1), en el grupo control se detectó una disminución de la presencia de paxilina en la membrana basal (punta

de flecha) de las CEU (Fig. 11 A) respecto a este mismo grupo en el día 3 (Fig. 10 A). En cambio, en ambos grupos tratados con BPA (Fig. 11 B-C y Tabla 1), se observó un incremento en la tinción basal (punta de flecha) respecto a este mismo grupo en el día 3 (Fig. 10 B-C y Tabla 1). Además, esta tinción basal (punta de flecha) fue mayor en los grupos tratados con BPA respecto a la tinción del grupo control en este mismo día (Fig. 11 y Tabla 1).

La tinción en la región apical (flecha) de las CEU en el grupo control durante el DG 6 (Fig. 11 A y Tabla 1) aumentó con respecto a ese mismo grupo en el día 3 (Fig. 10 A). Por otra parte, los grupos tratados con BPA (Fig. 11 B-C y Tabla 1), presentaron un aumento en la expresión de paxilina en la región apical (flecha) con respecto al grupo control (Fig. 11 A). Así mismo, todos los tratamientos expresaron escasa tinción de paxilina en la región lateral (Fig. 11 y Tabla 1).

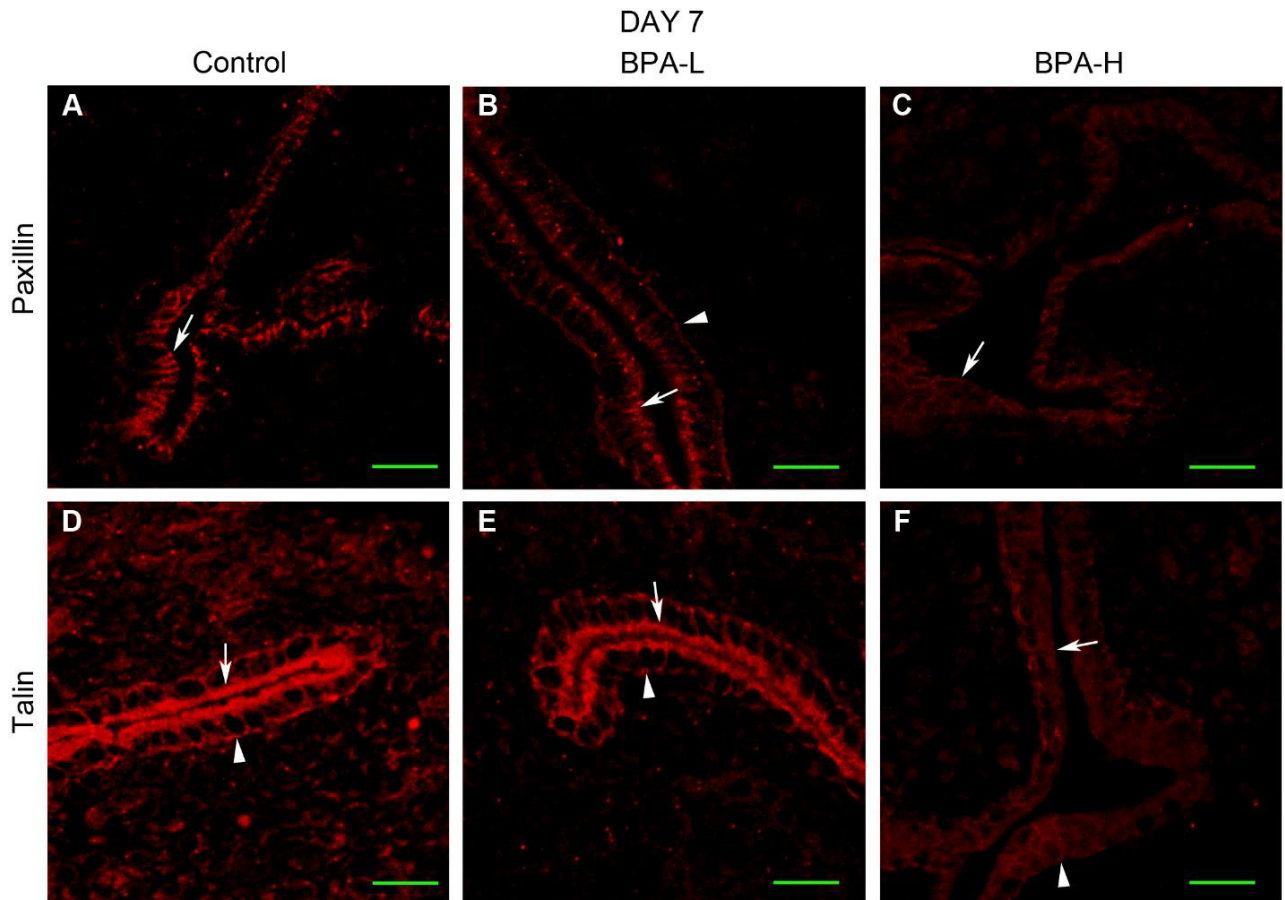
En este día (DG 6), no se detectó expresión de talina en la membrana basal en ninguno de los tres grupos. Sin embargo, si presentó tinción talina en la membrana apical de las CEU (Fig. 11 D-F, flecha) en los tres grupos, mostrando un aumento con respecto al DG 3 (Fig. 10), aunque la intensidad de la tinción fue similar entre los grupos BPA-H y control (Fig. 11 D-F, respectivamente), y menor en el grupo BPA-L (Fig. 11 E).

También se observó un incremento la presencia de esta proteína en la membrana lateral de las CEU en los tres grupos (Fig. 11 y Tabla 1), respecto al día de gestación 3 (Fig. 10), siendo más intensa la tinción en los grupos tratados con BPA (Fig. 11 E-F), en comparación con el grupo control (Fig. 11 D).

El grupo control fue el único que presentó tinción citoplasmática difusa (Fig. 11 D).

Estos resultados indican que hay un incremento en ambos grupos de tratamiento en la expresión de paxilina y talina en la región basal y en la región apical con respecto al control, por lo que este incremento podría impedir que las CEU estén menos adheridas a la ECM, y por lo tanto impedir su muerte para permitir que penetre el blastocisto.

#### 8.4. Día 7 de gestación



*Fig. 12* Expresión de talina y paxilina en útero de rata en el día 7 de gestación. Control: grupo sin tratamiento. BPA-L: grupo tratado con dosis baja. BPA-H: grupo tratado con dosis alta. Barra de escala = 20  $\mu$ m

En el día 7 el blastocisto penetra hacia el estroma. En este día, en los grupos, control y BPA-H (Fig. 12 A-C), no se detectó la presencia de paxilina en la membrana basal de las CEU, pero si se detectó la proteína en esta región en las muestras de los animales tratados con BPA-L (Fig. 12 B). La tinción de paxilina en la membrana apical (flecha) de las CEU disminuyó en todos los grupos respecto a la que se observó en el DG 6 (Fig. 11, Fig. 12, y Tabla 1). En el DG 7 la intensidad de la señal fue similar en los grupos control y BPA-L (Fig. 12 A-B, respectivamente), y disminuyó en el tratamiento BPA-H (Fig. 12 C). Se observó la presencia de paxilina en la membrana lateral de las CEU en todos los grupos, presentando una menor expresión en los grupos tratados con BPA (Fig. 12 B-C) respecto al grupo control (Fig. 12 A).

En cuanto a la expresión de la proteína talina en el séptimo día de gestación, la volvemos a detectar en la membrana basal (punta de flecha) de las CEU en todos los grupos (Fig. 12 y Tabla 1) en contraste con el DG 6 en el que no la detectamos en esta ubicación (Fig. 11 y Tabla 1). La intensidad de esta tinción en la región basal fue menor en los grupos tratados con BPA con respecto al control (Fig. 12, punta de flecha). En el grupo control, la tinción en la membrana apical (flecha) y lateral fue más intensa en este día respecto al observado en este grupo en el DG 6. Se observó tinción de la proteína talina en la región apical (flecha) en los tres grupos, presentándose la tinción más intensa en el grupo control (Fig. 12 D) y ésta disminuyó en los grupos tratados con BPA, presentándose la menor intensidad de tinción en el grupo BPA-H (Fig. 12 F). Además, se observó la presencia de esta proteína en la membrana lateral de las CEU, en los tres grupos, presentando una tinción similar los grupos control y BPA-L (Fig. 12 D-E, respectivamente), y una menor tinción el grupo BPA-H (Fig. 12 F).

Estos resultados sugieren que en la disminución en la tinción de talina y paxilina en los grupos con tratamiento de BPA en la membrana apical podría afectar a la interacción que hay entre las células de las CEU y el blastocisto que se está implantando.

Los controles negativos de tejido uterino se tiñeron en ausencia de anticuerpos primarios y no se mostró tinción de inmunofluorescencia.

### 8.5. Tabla comparativa de los resultados de los tratamientos con Bisfenol A

*Tabla 1 Resumen de los resultados de los grupos de tratamiento del Bisfenol-A sobre la expresión de las proteínas de adhesión focal: talina y paxilina, en el útero de ratas durante la gestación temprana. Dónde: +: tinción escasa; ++: tinción moderada; +++: tinción media; ++++: tinción intensa; no: no se presentó tinción*

Proteína		Control		BPA-L		BPA-H	
Día 1	Paxilina	Basal	+	Basal	++	Basal	+
		Apical	+	Apical	+++	Apical	++
		Lateral	+	Lateral	++	Lateral	+
	Talina	Basal	+	Basal	++	Basal	++
		Apical	++	Apical	+++	Apical	+++
		Lateral	+	Lateral	no	Lateral	no
	Citoplasmático difuso	no	Citoplasmático difuso	++	Citoplasmático difuso	++	
Día 3	Paxilina	Basal	++	Basal	+	Basal	+
		Apical	++	Apical	++	Apical	++
		Lateral	+	Lateral	+	Lateral	+
	Talina	Basal	++	Basal	++	Basal	++
		Apical	++	Apical	++	Apical	++
		Lateral	no	Lateral	+	Lateral	+
	Citoplasmático difuso	+	Citoplasmático difuso	no	Citoplasmático difuso	no	
Día 6	Paxilina	Basal	+	Basal	++	Basal	++
		Apical	+++	Apical	++++	Apical	++++
		Lateral	+	Lateral	+	Lateral	++
	Talina	Basal	no	Basal	no	Basal	no
		Apical	+++	Apical	++	Apical	+++
		Lateral	+	Lateral	++	Lateral	++
	Citoplasmático difuso	++	Citoplasmático difuso	no	Citoplasmático difuso	no	
Día 7	Paxilina	Basal	no	Basal	++	Basal	no
		Apical	++	Apical	++	Apical	+
		Lateral	++	Lateral	+	Lateral	+
	Talina	Basal	++	Basal	+	Basal	+
		Apical	++++	Apical	++	Apical	+
		Lateral	++	Lateral	++	Lateral	+



## 9. Discusión

Durante las últimas décadas, las tasas de infertilidad y de abortos han aumentado en todo el mundo, afectando entre 10-15% de las parejas en los países desarrollados [113,114] Un factor importante de la reducción de la fertilidad es una implantación fallida, que se cree representa el 30-75% de las pérdidas preclínicas del embarazo en los seres humanos [115].

Este incremento en la infertilidad y pérdida temprana del embarazo está relacionado, entre otros factores, a la exposición de disruptores endocrinos, entre los cuales, el BPA es el más estudiado. En los últimos años, varios grupos de investigación han examinado los efectos del BPA sobre la fertilidad global. Se realizaron estudios epidemiológicos donde se examinaron si los niveles de BPA son más altos en mujeres infértiles en comparación con mujeres fértiles, tales como los realizados por Caserta et al. [44] y La Rocca et al. [45], los cuales indican que las mujeres infértiles tienen mayores niveles de BPA en suero en comparación con las mujeres fértiles.

Así mismo, en estudios de fertilización *in vitro* se ha observado una asociación lineal dosis-respuesta positiva entre la concentración urinaria de BPA y un aumento del fracaso de implantación [23]. Además, la relación entre el BPA y la alteración de la implantación se basa en estudios experimentales en animales, tales como los realizados por Berger, et al. [49,61,62], Pan, et al. [60], Li, et al. [13], Varayoud, et al. [64] y Xiao, et al. [5] que examinan los efectos de la exposición a BPA en etapas tempranas de la gestación informan un número reducido o una ablación completa de sitios de implantación en ratones y ratas en comparación con controles. Estos estudios incluyen dosis bajas y altas de BPA.

La implantación del blastocisto en el útero es un evento complejo y altamente regulado que involucra interacciones entre el blastocisto y las CEU. La implantación involucra una serie de eventos que consisten en la aposición, adhesión y penetración del blastocisto en las células deciduales endometriales, lo que se logra por la remoción de las CEU alrededor del sitio de implantación [67–69,71,72].



En modelos animales, se ha comprobado que la exposición al BPA produce efectos adversos en el tracto reproductor femenino y la exposición a este compuesto durante la implantación y placentación reduce el número de fetos y crías, y la tasa de supervivencia antes del destete [116,117]. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual el BPA ejerce estos efectos adversos es desconocido.

Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió si las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, del epitelio uterino de la rata durante la gestación temprana, se ven afectadas por la administración perinatal de dos dosis de BPA, evaluando el efecto de dos dosis del disruptor endocrino BPA sobre la expresión de las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina.

Las adhesiones focales son complejos estructurales que permiten una unión física entre la ECM y el citoesqueleto de actina, permitiendo la adhesión entre la célula y la lámina basal; están compuestas de complejos de proteínas estructurales y de señalización. Estas adhesiones focales están localizadas entre las células y la ECM y tienen una actividad importante en la dinámica de la adhesión celular. La paxilina es una molécula adaptadora que recluta a varias proteínas estructurales y de señalización al complejo de la adhesión focal [78,87,118,119]. La talina interacciona directamente con el dominio citoplásmico de la subunidad  $\beta$  de las integrinas y el citoesqueleto de actina [96,120–124].

Por lo tanto, la talina y la paxilina son componentes esenciales de las adhesiones focales y su detección por inmunofluorescencia se ha convertido en un método de rutina para visualizar las adhesiones focales [70,125–128].

Estudios ultraestructurales previos han demostrado que las CEU en el DG1 presentan engrosamientos de la membrana plasmática basal y la lámina basal, presentándose estructuras electro-densas, las cuales fueron identificadas como adhesiones focales. Sin embargo, al momento de la implantación, la membrana plasmática basal adquiere cambios dinámicos haciéndose más plegada y sinuosa, y la lámina basal incrementa su grosor y se pierden las adhesiones focales [99,100]. Así mismo, se han detectado por inmunofluorescencia proteínas de las adhesiones focales en las CEU durante los primeros días de la gestación.

Los resultados reportados para la expresión de ambas proteínas en las CEU durante la gestación temprana [70,73,76,79,98] concuerdan con nuestros resultados del grupo control, en el que se observa una disminución de la expresión de estas proteínas en la membrana basal en el día 6 de la gestación.

La formación de las adhesiones focales es inducida por la agrupación de integrinas específicas a lo largo de la membrana. Ya que la talina está en contacto directo con las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$ , la disociación de ambas integrinas del sitio de la adhesión focal probablemente induce la disociación de la paxilina y la talina del complejo, y como resultado lleva al desensamblaje de la adhesión focal observada en el momento de la implantación.

El desensamblaje de la adhesión focal es un proceso importante en el momento de la implantación que permite que disminuya la adhesión de las CEU a la lámina basal y facilita su remoción en el sitio de la implantación, de tal manera que el blastocisto pueda penetrar el epitelio hacia las células deciduales endometriales [70,73,79]. Estudios previos han reportado que las CEU presentan apoptosis en el sitio de implantación [69] [129].

A diferencia de lo anteriormente reportado, en el presente trabajo se detectó la expresión de ambas proteínas en las CEU del grupo control en la membrana apical, teniendo ésta una mayor presencia en el DG 6 y 7. En los trabajos anteriores [73], sólo se había reportado la expresión de talina en la membrana apical durante el día 1.

Esta diferencia se puede deber a los anticuerpos utilizados en cada estudio. El anticuerpo utilizado en el presente estudio (sc-15336, Santa Cruz Biotechnology, CA) fue producido utilizando el fragmento N-terminal (aminoácidos 1-300) de la talina de origen humano, mientras que el usado en los estudios publicados por los grupos de Kaneko, et al. [70,73,76,79] y Lindsay et al. [98] (Sigma: Mouse monoclonal anti-talin antibody) es un anticuerpo que reconoce un epítipo presente en la molécula intacta de talina (225 kDa) y el fragmento C-terminal de 190 kDa, pero no el fragmento N-terminal de 47 kDa. Los fragmentos de 190 y 47 kDa se producen cuando la talina es cortada por la calpaína II [84,130] separando la cabeza

N-terminal de la cola C-terminal. En estudios en plaquetas estimuladas con trombina, la calpaína II corta la talina generando los fragmentos de 190 y 47 KDa. Por microscopia inmunoelectrónica se detectó que el fragmento de 47 KDa se localiza en la zona submembranaral, justo debajo de la membrana plasmática, mientras que la mayoría del fragmento de 190 kDa permanece difuso en el citoplasma [131]. Esta proteólisis de talina también se ha reportado en células CHO de ovario de hámster chino, en las que se ha visto que la talina asociada a la membrana es cortada produciendo un fragmento de 200-190 kDa (por lo tanto se produce en las adhesiones focales) y después es liberada en el citosol [132].

Sin embargo, se ha reportado que otras proteínas de adhesiones focales, la integrina  $\beta 3$  y la FAK, presentan la misma dinámica que la que nosotros observamos en nuestro estudio.

La integrina  $\beta 3$  disminuye en la membrana basal de las CEU en el DG 6 y se localiza en la membrana apical durante este día. Se ha observado que la integrina  $\beta 3$  se expresa en la membrana apical de las CEU durante la gestación temprana tanto en rata [73] como en otras especies como ratón [102], oveja [103] y cerdo [104]. En humanos, la expresión anormal de integrinas se ha relacionado con infertilidad inexplicable [106,108,109] y endometriosis [109–111]. Así mismo, se ha observado que la integrina  $\beta 3$  también se relocaliza del citoplasma a la membrana apical de las células del trofoblasto y de las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto en el momento en que se adhieren a células endometriales (Ishikawa). Esta relocalización no se observó si el blastocisto es adherido a un cubreobjetos de vidrio. Más aún, experimentos en células Ishikawa (línea celular de adenocarcinoma endometrial) en las que se elimina la expresión de integrina  $\beta 3$  con siRNA, presentaron una reducción significativa de la adhesión del blastocisto, demostrando la importancia de la localización apical de la integrina  $\beta 3$  en las CEU para la interacción embrión-blastocisto [73].

Otra proteína de adhesión focal que se ha visto que se localiza en la membrana apical de las CEU durante el DG6 es la proteína FAK, que es una protein cinasa [133].

Se ha observado que FAK interactúa con talina [134] y paxilina [135] en las adhesiones focales. Así mismo, se ha detectado la expresión de esta proteína en la membrana apical de las células del trofoblasto del blastocisto al cultivarlos en presencia de células endometriales Ishikawa. El dominio de orientación a la adhesión local (FAT) que contiene FAK, está implicado en la localización de FAK a sitios de adhesión focal [90,92]. El dominio FAT contiene sitios de unión para las proteínas de adhesión focal paxilina y talina, que conjuntamente parecen mediar en la fijación a la unión focal [93,94]. El dominio FAT contiene sitios de unión para las proteínas de adhesión focal paxilina y talina, que conjuntamente parecen mediar en la fijación a la unión focal [93,94]. El dominio C-terminal de FAT media este reclutamiento por asociación con paxilina a través de dos sitios de unión para los motivos LD de paxilina, formados por hélices H1/H4 y H2/H3 en lados opuestos de la molécula. FAT también interactúa con talina, y puede contribuir al reclutamiento de cualquiera de los participantes de las adhesiones focales [91].

Estos resultados han sugerido que la localización de la integrina  $\beta 3$  y la FAK tiene un comportamiento importante para la adhesión del blastocisto a las CEU durante este día. Ya que paxilina y talina presentan interacciones directas con la integrina  $\beta 3$  y FAK, es congruente que las detectemos en el presente trabajo en la membrana apical de las CEU, formando parte de la adhesión focal que permite la adhesión del blastocisto a las CEU.

Para que las integrinas del blastocisto se activen es necesario que se unan a un ligando de la ECM, la cual también se une a la integrina complementaria en las CEU. La integrina  $\beta 3$  se une a varios ligandos de la ECM incluyendo vitronectina, fibronectina, fibrinógeno, factor de von Willebrand, trombospondina, colágeno y osteopontina [136–138]. Cualquiera de estas proteínas puede actuar como un ligando que une al blastocisto a las CEU. Se ha demostrado la interacción entre fibronectina y las integrinas presentes en el blastocisto [139,140]. Así mismo, se ha demostrado que la secreción de osteopontina, que es un ligando para la integrina  $\alpha V\beta 3$ , se incrementa en la fase secretora del ciclo menstrual en humanos [141–143] y la expresión de osteopontina en CEU de ratón se incrementa en el momento de la implantación [144]. También se ha detectado la expresión de osteopontina en células Ishikawas [142].

Todos los datos anteriores han permitido plantear un modelo de la función de las adhesiones focales en la implantación del blastocisto.

Al principio de la gestación, las adhesiones focales se ubican en la membrana basal de las CEU para mantener una barrera epitelial.

En el DG 6, las adhesiones focales se pierden en la membrana basal de las CEU, lo que les permite estar menos adheridas a la lámina basal, lo que permitirá su desprendimiento y permitiendo al blastocisto penetrar hacia las células deciduales para la formación de la placenta. En este mismo día, las proteínas de las adhesiones focales se localizan en la membrana apical de las CEU, así como en la membrana apical de las células de los trofoblastos de los blastocistos. Esta localización permite establecer una conexión entre el blastocisto y las CEU que le permiten al blastocisto adherirse a las CEU en este día.

Los resultados de nuestro grupo control concuerdan con este modelo, ya que observamos una disminución en la expresión de paxilina y talina en la membrana basal en el DG 6 y un aumento en su localización en la membrana apical.

Respecto a los animales tratados con BPA, este es el primer estudio que describe como se altera la expresión de estas proteínas por el tratamiento perinatal con este disruptor endocrino.

El DG 1 corresponde al día siguiente al apareamiento. Durante este día, ambas dosis de BPA indujeron un aumento de la expresión de paxilina y talina en la membrana apical de las CEU, respecto al grupo control. Así mismo, ambos tratamientos de BPA indujeron un incremento en la expresión de talina en la membrana basal de las CEU, y en lugar de detectarla en la membrana lateral, la localizamos como una tinción citoplásmica difusa.

El tratamiento BPA-L también indujo un incremento en la expresión de paxilina en la membrana basal y lateral respecto al control. Por lo tanto, durante este día se observa en general que ambos tratamientos con BPA inducen un incremento en la expresión de ambas proteínas. El incremento en la expresión de ambas proteínas en la membrana basal de las CEU podría indicar un incremento en la formación de

adhesiones focales en la membrana basal, la cual es necesaria en esta etapa para mantener una barrera epitelial íntegra en el útero. Sin embargo, es de llamar la atención el incremento tan importante que se detecta en la expresión de ambas proteínas en la membrana apical de las CEU. Este incremento nos indica un desfase en los patrones de expresión de estas proteínas, que podría deberse al incremento en la secreción de proteínas que sirven como ligando para las integrinas (como fibronectina y osteopontina), ya que se ha visto que al exponer blastocistos a fibronectina se da un tráfico de integrinas ( $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 11\beta 3$ ) hacia la parte apical de la membrana de los trofoblastos [140,145].

Durante el DG 3, se presentan pocos cambios entre los grupos tratados y el grupo control, sólo se observa una disminución de la expresión de paxilina en la membrana basal de las CEU en los grupos tratados respecto al grupo control, y la talina se detectó en la membrana lateral de las CEU, pero no en la ubicación citoplasmática difusa.

En el momento de la implantación, DG 6, la tinción de paxilina aumentó en ambos grupos tratados en la membrana basal respecto al grupo control. Este incremento podría impedir que las CEU estén menos adheridas a la ECM, y por lo tanto impedir su muerte para permitir que penetre el blastocisto. Al igual que en el DG 1, también se observa un incremento en la expresión de paxilina en la membrana apical de las CEU de ambos grupos tratados respecto al grupo control.

Durante el DG 7 el blastocisto penetra hacia el estroma, en ambos grupos tratados se observa una disminución en la tinción de talina en la membrana apical de las CEU, y disminución en la expresión de paxilina en esta misma ubicación en el grupo BPA-H, todos respecto al grupo control. Esto podría afectar a la interacción que hay entre las células de las CEU y el blastocisto que se está implantando.

Resultados similares se han reportado para la expresión de la integrina  $\beta 3$  en el útero de ratones tratados con BPA (200, 400, o 600 mg/kg/día BPA) del DG 0.5 al DG 4.5. En todos los grupos tratados se observó una disminución en la expresión de la integrina  $\beta 3$  en las CEU en el DG 5 [112]. Mientras en ese estudio ven el efecto directo del BPA en el animal que se le administró el disruptor endocrino (F0), en

nuestro trabajo vemos el efecto en las crías (F1) que estuvieron expuestas al BPA *in utero* y a través de la leche materna. Como podemos observar, las dosis administradas en el trabajo de Pan et al. [112] son mucho mayores a las utilizadas en el presente trabajo (0.05 y 20 mg/kg/día), lo cual confirma que la exposición a disruptores endocrinos en periodos críticos del desarrollo puede llevar a efectos que se presentan a largo plazo en los individuos.

Todos estos cambios observados en los grupos tratados con BPA, nos indican que el tratamiento perinatal con BPA induce cambios en la expresión y localización de las proteínas paxilina y talina en las CEU durante los primeros días de la gestación que podrían afectar el proceso de implantación del blastocisto.

Ya que la pérdida de proteínas de adhesión focal es controlada por la progesterona y se limita a las CEU, porque la paxilina y la talina en las células epiteliales glandulares permanecen inalteradas durante el embarazo y en respuesta al tratamiento hormonal de ratas ovariectomizadas; por lo que sólo las CEU reestructuran la membrana plasmática durante el embarazo temprano, ya que sólo ellas hacen el primer contacto con el blastocisto [70,79].

Existe un mecanismo sugerido por el cual la exposición crónica a BPA interrumpe la función uterina durante el embarazo temprano publicado por el grupo de Li et al. [13], en donde examinaron primero la expresión de PGR en muestras de útero de ratón expuestas al vehículo o al BPA recogidas 12 horas después de la administración de E<sub>2</sub>. Este período corresponde al tiempo de unión del blastocisto al epitelio luminal receptivo en ratones. La inmunohistoquímica y el análisis de la expresión génica demostraron que la expresión de PGR en el epitelio era baja, pero comparable en ambos en el control y en los tejidos uterinos expuesto a BPA, la expresión de PGR en el estroma se redujo significativamente en el útero de los ratones que fueron expuestos al BPA. Colectivamente estos resultados indican que BPA selectivamente interfiere con las vías de señalización mediadas PGR en el útero durante el embarazo temprano. En muchas especies incluyendo ratones, el estado receptivo está marcado por un cese en la proliferación de CEU antes de la implantación.

Por lo tanto, las exposiciones que interfieren con la implantación tienen el potencial de afectar la fertilidad.

## **10. Conclusiones**

Este es el primer estudio que describe el efecto de la administración de bisfenol A (BPA) en ratas, durante el período perinatal y en la expresión de proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, en el útero durante el embarazo temprano.

La generación F1 de ratas, las cuales recibieron el compuesto en útero y durante la lactancia a través de su madre (F0), generó un cambio en la expresión y localización de las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, en los grupos de animales tratados con BPA respecto a los animales control. Por lo que se sugiere que el BPA consumido por la madre fue transferido a las crías durante la gestación y lactancia, ya que se observó modificación de la expresión de las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina.

Las diferencias observadas en cuanto a la expresión y localización de las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, en específico en el momento de implantación (DG 6) en el cual no se observa una disminución en la expresión en la región basal de las proteínas de adhesión focal en el epitelio uterino de los grupos de ratas tratadas con BPA comparándolos con el grupo control, por lo que no permite que la lámina sea menos adherente y obstaculizando al blastocisto penetrar hacia las células deciduales para la formación de la placenta. Estos cambios observados en los grupos tratados con BPA nos indican que el tratamiento perinatal con BPA induce cambios en la expresión y localización de las proteínas paxilina y talina en las CEU durante los primeros días de la gestación que podrían afectar el proceso de implantación del blastocisto.

En resumen, el tratamiento con BPA durante el período perinatal perturbó, cuando los animales (F1) alcanzaron la edad adulta y quedaron preñados, la expresión particular de las proteínas de adhesión focal, talina y paxilina, en el epitelio uterino. Estos resultados sugieren que la exposición perinatal a BPA, tiene un efecto en el útero durante la gestación temprana para interrumpir la implantación intrauterina.



Estos hallazgos podrían contribuir a la comprensión del mecanismo molecular para la receptividad endometrial, y los riesgos de efectos adversos de la exposición a BPA para el sistema reproductivo.

Cabe mencionar que los efectos de los disruptores endocrinos 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.

## **11. Perspectivas**

A pesar de que existen muchos estudios de los efectos en la salud que causa el BPA, aún son pocos los trabajos a nivel molecular en el que se estudia el posible mecanismo de acción. Es por ello que es necesario seguir realizando este tipo de estudios para tener una mejor comprensión de este disruptor endocrino. Así mismo, como principio preventivo y precautorio, se requieren más investigaciones, en particular durante la etapa de desarrollo fetal y la infancia, ya que pueden ser las etapas más susceptibles a los efectos adversos de este compuesto omnipresente tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Por otro lado, en realidad estamos expuestos a una mezcla de contaminantes, por lo que no se debe pasar por alto la posibilidad de efectos aditivos y sinérgicos del BPA con otros compuestos predominantes.

## **12. Referencias**

1. Balabanič D, Rupnik M, Klemenčič AK. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. *Reprod Fertil Dev* 2011;**23**:403-16.
2. Nava Carrillo K, Mendoza-Rodríguez CA, Romano-Riquer P *et al.* Educación química. *Educ química* 2008;**19**:27-33.
3. Kandarakis ED, Bourguignon JP, Giudice LC *et al.* Endocrine - Disrupting Chemicals : An Endocrine Society Scientific Statement. 2009;**30**:293-342.
4. Fenichel P, Chevalier N, Brucker-Davis F. Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. *Ann Endocrinol (Paris)* 2013;**74**:211-20.
5. Xiao S, Diao H, Smith MA *et al.* Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice. *Reprod Toxicol* 2011;**32**:434-41.
6. vom Saal FS. A physiologically based approach to the study of BPA and other

estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998;**14**:239-60.

7. Yamamoto T, Yasuhara A. Quantities of bisphenol a leached from plastic waste samples. *Chemosphere* 1999;**38**:2569-76.

8. Tsutsumi O. Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;**93**:325-30.

9. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL *et al.* 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**:110-5.

10. Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F *et al.* In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007;**24**:199-224.

11. Mueller SO, Korach KS. Mechanisms of Estrogen Receptor-Mediated Agonistic and Antagonistic Effects. 2001;**3**:1-25.

12. Rehan M, Ahmad E, Sheikh IA *et al.* Androgen and progesterone receptors are targets for bisphenol a (BPA), 4-methyl-2,4-bis-(p-hydroxyphenyl)pent-1-ene-A potent metabolite of BPA, and 4-tert-octylphenol: A computational insight. *PLoS One* 2015;**10**:1-18.

13. Li Q, Davila J, Bagchi MK *et al.* Chronic exposure to bisphenol a impairs progesterone receptor-mediated signaling in the uterus during early pregnancy. *Recept Clin Investig* 2016;**3**:1-13.

14. Bhurke AS, Bagchi IC, Bagchi MK. Progesterone-Regulated Endometrial Factors Controlling Implantation. *Am J Reprod Immunol* 2016;**75**:237-45.

15. Ellmann S, Sticht H, Thiel F *et al.* Estrogen and progesterone receptors: From molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 2009;**66**:2405-26.

16. Muhamad MS, Salim MR, Lau WJ *et al.* A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environ Sci Pollut Res* 2016;**23**:11549-67.

17. Staples C a, Dom PB, Klecka GM *et al.* A review of the environmental fate, effects, and exposures of Bisphenol A. *Chemosphere* 1998;**36**:2149-73.

18. Takao Y, Lee HC, Kohra S *et al.* Release of Bisphenol A from Food Can Lining upon Heating. *J Heal Sci* 2002;**48**:331-4.

19. Goodson A, Robin H, Summerfield W *et al.* Migration of bisphenol A from can coatings - Effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit Contam* 2004;**21**:1015-26.

20. Taylor P, Yoshida T, Horie M *et al.* Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid

chromatography. 2012;**18**:37-41.

21. López-Cervantes J, Paseiro-Losada P. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit Contam* 2003;**20**:596-606.

22. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM *et al.* 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**:131-8.

23. Ehrlich S, Williams PL, Missmer SA *et al.* Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2012;**27**:3583-92.

24. Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environ Toxicol Pharmacol* 2016;**47**:182-99.

25. Inoue K, Kawaguchi M, Funakoshi Y *et al.* Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2003;**798**:17-23.

26. Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K *et al.* Bisphenol A levels in human urine. *Environ Health Perspect* 2003;**111**:101-4.

27. Yang M, Kim SY, Lee SM *et al.* Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;**44**:546-51.

28. Rudel RA, Gray JM, Engel CL *et al.* Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: Findings from a dietary intervention. *Environ Health Perspect* 2011;**119**:914-20.

29. Calafat AM, Ye X, Wong LY *et al.* Exposure of the U.S. population to Bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008;**116**:39-44.

30. Becker K, Göen T, Seiwert M *et al.* GerES IV: Phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* 2009;**212**:685-92.

31. He Y, Miao M, Herrinton LJ *et al.* Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res* 2009;**109**:629-33.

32. Yamano Y, Miyakawa S, Iizumi K *et al.* Long-term study of urinary bisphenol A in elementary school children. *Environ Health Prev Med* 2008;**13**:332-7.

33. Ye X, Pierik FH, Hauser R *et al.* 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**:260-7.

34. Calafat AM, Weuve J, Ye X *et al.* Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environ Health Perspect* 2009;**117**:639-44.

35. Cantonwine D, Meeker JD, Hu H *et al.* Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environ Heal* 2010;**9**:62.
36. Lewis RC, Meeker JD, Peterson KE *et al.* Predictors of urinary bisphenol A and phthalate metabolite concentrations in Mexican children. *Chemosphere* 2013;**93**:2390-8.
37. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y *et al.* Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002;**17**:2839-41.
38. Padmanabhan V, Siefert K, Ransom S *et al.* Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? 2008;**28**, DOI: 10.1038/sj.jp.7211913.
39. Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H *et al.* Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-foetal-placental unit. *Env Heal Perspect* 2002;**110**:A703 to A707.
40. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M *et al.* Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;**24**:139-77.
41. Ziv-Gal A, Flaws JA. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007–2016). *Fertil Steril* 2016;**106**:827-56.
42. Bergeron RM, Thompson TB, Leonard LS *et al.* Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 1999;**150**:179-87.
43. Martínez-Peña AA, Rivera-Baños J, Méndez-Carrillo LL *et al.* Perinatal administration of bisphenol A alters the expression of tight junction proteins in the uterus and reduces the implantation rate. *Reprod Toxicol* 2017;**69**:106-20.
44. Caserta D, Bordi G, Ciardo F *et al.* The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women. *Gynecol Endocrinol* 2013;**29**:444-7.
45. La Rocca C, Tait S, Guerranti C *et al.* Exposure to endocrine disrupters and nuclear receptor gene expression in infertile and fertile women from different italian areas. *Int J Environ Res Public Health* 2014;**11**:10146-64.
46. Buck Louis GM, Sundaram R, Sweeney AM *et al.* Urinary bisphenol A, phthalates, and couple fecundity: The Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment (LIFE) Study. *Fertil Steril* 2014;**101**:1359-66.
47. Vélez MP, Arbuckle TE, Fraser WD. Female exposure to phenols and phthalates and time to pregnancy: The Maternal-Infant Research on Environmental Chemicals (MIREC) Study. *Fertil Steril* 2015;**103**:1011-1020.e2.
48. Jukic AMZ, Calafat AM, McConnaughey DR *et al.* Urinary concentrations of phthalate metabolites and bisphenol-A and follicular phase length, fecundability, and early pregnancy loss. *Env Heal Perspect* 2015;**124**:1-31.
49. Berger RG, Hancock T, deCatanzaro D. Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reprod Toxicol* 2007;**23**:138-44.

50. Cabaton NJ, Wadia PR, Rubin BS *et al.* Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 2011;**119**:547-52.
51. Wang W, Hafner KS, Flaws JA. In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;**276**:157-64.
52. Ziv-Gal A, Wang W, Zhou C *et al.* The effects of in utero bisphenol A exposure on reproductive capacity in several generations of mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;**284**:354-62.
53. Kendzierski JA, Kendig EL, Gear RB *et al.* Strain specific induction of pyometra and differences in immune responsiveness in mice exposed to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol or the endocrine disrupting chemical bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2012;**34**:22-30.
54. Kobayashi K, Ohtani K, Kubota H *et al.* Dietary exposure to low doses of bisphenol A: Effects on reproduction and development in two generations of C57BL/6J mice. *Congenit Anom (Kyoto)* 2010;**50**:159-70.
55. Kobayashi K, Kubota H, Ohtani K *et al.* Lack of effects for dietary exposure of bisphenol A during in utero and lactational periods on reproductive development in rat offspring. *J Toxicol Sci* 2012;**37**:565-73.
56. Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM *et al.* In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicol Sci* 2009;**114**:133-48.
57. Santamaría C, Durando M, Muñoz De Toro M *et al.* Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;**158**:220-30.
58. Xi W, Lee CKF, Yeung WSB *et al.* Effect of perinatal and postnatal bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 2011;**31**:409-17.
59. Zhang HQ, Zhang XF, Zhang LJ *et al.* Fetal exposure to bisphenol a affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep* 2012;**39**:5651-7.
60. Pan X, Wang X, Sun Y *et al.* Inhibitory effects of preimplantation exposure to bisphenol-A on blastocyst development and implantation. *Int J Clin Exp Med* 2015;**8**:8720-9.
61. Berger RG, Shaw J, deCatanzaro D. Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17 $\beta$ -estradiol. *Reprod Toxicol* 2008;**26**:94-9.
62. 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. *Reprod Toxicol*

2010;**30**:393-400.

63. Li Q, Davila J, Kannan A *et al.* Chronic exposure to bisphenol a affects uterine function during early pregnancy in mice. *Endocrinology* 2016;**157**:1764-74.

64. Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL *et al.* Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology* 2011;**152**:1101-11.

65. Borman ED, Foster WG, Greenacre MKE *et al.* Stress lowers the threshold dose at which bisphenol A disrupts blastocyst implantation, in conjunction with decreased uterine closure and e-cadherin. *Chem Biol Interact* 2015;**237**:87-95.

66. Crawford BR, deCatanzaro D. Disruption of blastocyst implantation by triclosan in mice: Impacts of repeated and acute doses and combination with bisphenol-A. *Reprod Toxicol* 2012;**34**:607-13.

67. Schlafke S, Enders AC. Cytological changes during cleavage and blastocyst formation in the rat. *J Anat* 1967;**102**:13-32.

68. Enders AC, Schlafke S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat* 1969;**125**:1-29.

69. Welsh AO. Uterine Cell-Death During Implantation and Early Placentation. *Microsc Res Tech* 1993;**25**:223-45.

70. Kaneko YY, Lindsay LALA, Murphy CRCR. Focal adhesions disassemble during early pregnancy in rat uterine epithelial cells. *Reprod Fertil Dev* 2008;**20**:892-9.

71. Finn CA, Porter DG. *The uterus - Handbooks in reproductive biology*. 1<sup>a</sup>. California: Elek, 1975.

72. Wynn RM. *Biology of the Uterus*. 1<sup>a</sup>. London: Plenum Press, 1977.

73. Kaneko Y, Lecce L, Day ML *et al.*  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 Integrins Disassemble From Basal Focal Adhesions and  $\beta$ 3 Integrin Is Later Localised To the Apical Plasma Membrane of Rat Uterine Luminal Epithelial Cells At the Time of Implantation. *Reprod Fertil Dev* 2011;**23**:481-95.

74. Yoo Y, Guan J-L. Integrin Signaling Through Focal Adhesion Kinase. En: LaFlamme SE, Kowalczyk A (eds.). *Cell Junctions: Adhesion, Development, and Disease*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, 25-46.

75. Tumbarello DA, Turner CE. The Paxillin Family and Tissue Remodeling. En: LaFlamme SE, Kowalczyk A (eds.). *Cell Junctions. Adhesion, Development, and Disease*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, 47-69.

76. Kaneko Y, Day ML, Murphy CR. Uterine epithelial cells: Serving two masters. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;**45**:359-63.

77. Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 2008;**121**:2435-44.

78. Turner CE. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* 2000;**2**:E231-6.

79. Kaneko Y, Lecce L, Murphy CR. Ovarian hormones regulate expression of the focal adhesion proteins, talin and paxillin, in rat uterine luminal but not glandular epithelial cells. *Histochem Cell Biol* 2009;**132**:613-22.
80. Nayal A, Webb DJ, Horwitz AF. Talin: An emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2004;**16**:94-8.
81. Haining AWM, Lieberthal TJ, Del Río Hernández A. Talin: A mechanosensitive molecule in health and disease. *FASEB J* 2016;**30**:2073-85.
82. Yan J, Yao M, Goult BT *et al.* Talin Dependent Mechanosensitivity of Cell Focal Adhesions. *Cell Mol Bioeng* 2015;**8**:151-9.
83. Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;**14**:503-17.
84. Lawson C, Schlaepfer DD. Integrin adhesions: Who's on first? What's on second?: Connections between FAK and talin. *Cell Adhes Migr* 2012;**6**:302-6.
85. Banno A, Ginsberg MH. The Ins and Outs of Integrin Signaling. En: LaFlamme SE, Kowalczyk A (eds.). *Cell Junctions: Adhesion, Development, and Disease*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, 3-23.
86. Kwak TK, Lee MS, Ryu J *et al.* Cell adhesion-dependent serine 85 phosphorylation of paxillin modulates focal adhesion formation and haptotactic migration via association with the C-terminal tail domain of talin. *J Biol Chem* 2012;**287**:27499-509.
87. Brown MC, Turner CE. Paxillin : Adapting to Change. 2004:1315-39.
88. López-Colomé AM, Lee-Rivera I, Benavides-Hidalgo R *et al.* Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol* 2017;**10**:50.
89. Dong J-M, Lau L-S, Ng Y-W *et al.* Paxillin nuclear-cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation of the LD 4 motif: evidence that nuclear paxillin promotes cell proliferation. *Biochem J* 2009;**418**:173-84.
90. Goni GM, Epifano C, Boskovic J *et al.* Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate triggers activation of focal adhesion kinase by inducing clustering and conformational changes. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:E3177-86.
91. Kadaré G, Gervasi N, Brami-Cherrier K *et al.* Conformational dynamics of the focal adhesion targeting domain control specific functions of focal adhesion kinase in cells. *J Biol Chem* 2015;**290**:478-91.
92. Zhou J, Bronowska A, Le Coq J *et al.* Allosteric Regulation of Focal Adhesion Kinase by PIP2 and ATP. *Biophys J* 2015;**108**:698–705.
93. Hayashi I, Vuori K, Liddington RC. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol* 2002;**9**:101-6.
94. Scales TME, Parsons M. Spatial and temporal regulation of integrin signalling

during cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2011;**23**:562-8.

95. Deramautd TB, Dujardin D, Noulet F *et al.* Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. *PLoS One* 2014;**9**, DOI: 10.1371/journal.pone.0092059.

96. Calderwood D a, Ginsberg MHMH. Talin forges the links between integrins and actin. *Nat Cell Biol* 2003;**5**:694-7.

97. Wang P, Ballestrem C, Streuli CH. The C terminus of talin links integrins to cell cycle progression. *J Cell Biol* 2011;**195**:499-513.

98. Lindsay LA, Dowland SN, Murphy CR. Uterine focal adhesions are retained at implantation after rat ovarian hyperstimulation. *Reproduction* 2016;**152**:753-63.

99. Shion YL, Murphy CR. The basal plasma membrane and lamina densa of uterine epithelial cells are both altered during early pregnancy and by ovarian hormones in the rat. *Eur J Morphol* 1995;**33**:257–264.

100. Murphy CR. Junctional barrier complexes undergo major alterations during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells. *Hum Reprod* 2000;**15**:182-8.

101. Kaneko Y, Murphy CR, Day ML. Calpain 2 activity increases at the time of implantation in rat uterine luminal epithelial cells and administration of calpain inhibitor significantly reduces implantation sites. *Histochem Cell Biol* 2014;**141**:423-30.

102. Aplin JD, Spanswick C, Behzad F *et al.* Integrins beta 5, beta 3 and alpha v are apically distributed in endometrial epithelium. *Mol Hum Reprod* 1996;**2**:527-34.

103. Johnson GA, Bazer FW, Jaeger LA *et al.* Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biol Reprod* 2001;**65**:820-8.

104. Bowen J a, Bazer FW, Burghardt RC. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vitro. *Biol Reprod* 1997;**56**:409-15.

105. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA *et al.* Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994;**62**:497-506.

106. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C *et al.* Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992;**90**:188-95.

107. Lessey BA. Integrins and the endometrium: New markers of uterine receptivity. *Ann N Y Acad Sci* 1997;**828**:111-22.

108. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW *et al.* Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertil Steril* 1995;**63**:535-42.

109. Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L *et al.* Use of integrins to date the



endometrium. *Fertil Steril* 2000;**73**:779-87.

110. Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW *et al.* Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;**79**:650–652.

111. Regidor PA, Vogel C, Regidor M *et al.* Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium. *Hum Reprod Update* 1998;**4**:710-8.

112. Pan X, Wang XX, Wang Z *et al.* Bisphenol a influences blastocyst implantation via regulating integrin  $\beta$ 3 and trophinin expression levels. *Int J Clin Exp Med* 2015;**8**:20035-45.

113. Vite Vargas JA, Ortiz Núñez DA, Hernández Marín I *et al.* Epidemiological analysis of infertility in a Mexican population. *Ginecol Obstet Mex* 2005;**73**:360-4.

114. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update* 2014;**21**:411-26.

115. Macklon NS, Geraedts JPM, Fauser B. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;**8**:333.

116. Mendoza-Rodríguez CA, García-Guzmán M, Baranda-Avila N *et al.* Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reprod Toxicol* 2011;**31**:177-83.

117. Tachibana T, Wakimoto Y, Nakamuta N *et al.* Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. *J Reprod Dev* 2007;**53**:509-14.

118. Turner CE, Schaller MD, Parsons JT. Tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase pp125\_FAK\_ during development: relation to paxillin. *J Cell Sci* 1993;**105**:637-45.

119. Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 2001;**20**:6459-72.

120. Pfaff M, Liu S, Erle DJ *et al.* Integrin Beta Cytoplasmic Domains Differentially Bind to Cytoskeletal Proteins. *J Biol Chem* 1998;**273**:6104-9.

121. Calderwood DA, Zent R, Grant R *et al.* The talin head domain binds to integrin  $\beta$  subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* 1999;**274**:28071-4.

122. Calderwood DA. Integrin activation. *J Cell Sci* 2004;**117**:657-66.

123. Calderwood DA. Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* 2004;**32**:434-7.

124. LE L, Opinion C, Biology C *et al.* Focal adhesions – the cytoskeletal connection

David R Critchley. *Curr Opin Cell Biol* 2000;133-9.

125. Geiger B, Avnur Z, Rinnerthaler G *et al.* Microfilament-organizing centres in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion. *J Cell Biol* 1984;**99**:83-91.

126. Geiger B, Avnur Z, Kreis TE *et al.* The dynamics of cytoskeletal organization in areas of cell contact. *Cell Muscle Motil* 1984;**5**:195-234.

127. Burridge K, Fath K, Kelly T *et al.* Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1988;**4**:487-525.

128. Turner CE, Glenney JR, Burridge K. Paxillin: A new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol* 1990;**111**:1059-68.

129. Tassell W, Slater M, Barden JA *et al.* Endometrial cell death during early pregnancy in the rat. *Histochem J* 2000;**32**:373-9.

130. Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ *et al.* Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* 2004;**6**:977-83.

131. Hayashi M, Suzuki H, Kawashima S *et al.* The behavior of calpain-generated N- and C-terminal fragments of talin in integrin-mediated signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* 1999;**371**:133-41.

132. Tranqui L, Block MR. Intracellular processing of talin occurs within focal adhesions. *Exp Cell Res* 1995;**217**:149-56.

133. Kaneko Y, Lecce L, Day ML *et al.* Focal adhesion kinase localizes to sites of cell-to-cell contact in vivo and increases apically in rat uterine luminal epithelium and the blastocyst at the time of implantation. *J Morphol* 2012;**273**:639-50.

134. Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT *et al.* Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 1995;**270**:16995-9.

135. Turner CE, Miller JT. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J Cell Sci* 1994;**107** ( Pt 6):1583-91.

136. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;**69**:11-25.

137. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;**110**:673-87.

138. Sueoka K, Kuji N, Shiokawa S *et al.* Integrins and reproductive physiology: Expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertil Steril* 1997;**67**:799-811.

139. Schultz JF, Armant DR. Beta 1- and beta 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri-implantation blastocysts. Regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor. *J Biol Chem*

1995;**270**:11522-31.

140. Rout UK, Wang J, Paria BC *et al.*  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$  and the platelet-associated integrin  $\alpha IIb\beta 3$  coordinately regulate adhesion and migration of differentiating mouse trophoblast cells. *Dev Biol* 2004;**268**:135-51.

141. Brown LF, Berse B, Van De Water L *et al.* Expression and Distribution of Osteopontin in Human Tissues - Widespread Association with Luminal Epithelial Surfaces. *Mol Biol Cell* 1992;**3**:1169-80.

142. Apparao KBC, Murray MJ, Fritz MA *et al.* Osteopontin and its receptor  $\alpha v\beta 3$  integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:4991-5000.

143. Von Wolff M, Strowitzki T, Becker V *et al.* Endometrial osteopontin, a ligand of  $\beta 3$ -integrin, is maximally expressed around the time of the «implantation window». *Fertil Steril* 2001;**76**:775-81.

144. White FJ, Burghardt RC, Hu J *et al.* Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin) is expressed by stromal macrophages in cyclic and pregnant endometrium of mice, but is induced by estrogen in luminal epithelium during conceptus attachment for implantation. *Reproduction* 2006;**132**:919-29.

145. Armant DR. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol* 2005;**280**:260-80.