



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio por Western-Blot de la  
expresión de proteínas de uniones  
estrechas y adhesiones focales en el  
útero de ratas tratadas perinatalmente  
con bisfenol-A durante la gestación  
temprana.

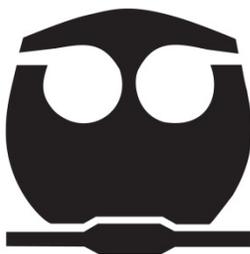
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO  
BIÓLOGO**

PRESENTA

**AARÓN GALINDO BUSTAMANTE**



México, Ciudad de México. 2017



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: Raquel Ortega Muñoz

Vocal: Sobeida Sánchez Nieto

Secretario: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

1<sup>er</sup>. Suplente: Euclides Ávila Chávez

2<sup>do</sup>. Suplente: Claudia Teresa Tovar Palacio

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio número 206 del edificio "F1"  
de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, U.N.A.M.

Asesor

---

Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Sustentante

---

Aarón Galindo Bustamante

## Índice

Abreviaturas.....	5
1. Resumen.....	7
2. Antecedentes.....	8
2.....	8
2.2 Efectos del BPA sobre los organismos .....	9
2.3 Cambios en la salud reproductiva .....	10
2.4 Infertilidad .....	11
2.4.1 BPA y su efecto en el útero. ....	13
2.4.2 BPA y su efecto en la gestación.....	14
2.4.3 BPA y su efecto en la implantación del blastocisto. ....	15
2.5 Uniones estrechas (UE).....	16
2.5.1 Uniones estrechas durante la gestación.....	17
2.5.2 Inmunohistoquímica de uniones estrechas en las células del epitelio uterino de la rata durante la gestación temprana.....	19
2.6 Adhesiones focales (AF) .....	30
2.6.1 Inmunohistoquímica de la proteína de adhesión focal paxilina en las células del epitelio uterino de la rata durante la gestación temprana.....	30
2.7 Importancia de las proteínas UE y AF en la gestación .....	35
3. Planteamiento del problema.....	36
4. Hipótesis .....	36
5. Objetivo general.....	36
5.1 Objetivos particulares .....	36
6. Metodología y Material .....	37
6.1 Animales.....	37
6.1.1 Tratamiento de la generación F0 .....	37
6.1.2 Tratamiento de F1 .....	38
6.2 Determinación de los sitios de implantación .....	38
6.3 Extracción de proteínas.....	38
6.4 Cuantificación de proteínas.....	39
6.4.1 Bradford .....	39

6.5 Western-Blot .....	40
6.5.1 Preparación de los geles .....	40
6.5.2 Preparación de las muestras.....	41
6.5.3 Ensamblaje del módulo de electroforesis y carga de muestras. .....	41
6.6 Transferencia .....	42
6.7 Preparación de anticuerpos y membranas.....	43
6.8 Revelado y cuantificación. ....	44
6.9 Análisis de datos .....	44
7. Resultados .....	45
7.1 Efecto del BPA en los niveles de proteínas de UE en el útero de rata. ....	45
7.2 Efecto del BPA en los niveles paxilina en el útero de rata. ....	48
8. Discusión .....	50
9. Conclusión.....	58
10. Referencias.....	59
11. Anexo A. Amortiguadores .....	72
12. Anexo B. Soluciones para inmunoréplicas tipo Western. ....	75

## **Abreviaturas**

Acua Acuaporinas

ADI Nivel aceptable de ingestión

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AF Adhesiones focales

ANOVA Análisis de varianza

Blast Blastocisto

BPA Bisfenol-A

BPA-A Bisfenol-A dosis alta (20 mg/kg/día)

BPA-B Bisfenol-A dosis baja (0.05 mg/kg/día)

BSA Albúmina de suero bovino

C Control

CE Células estromales

CEU Células del epitelio luminal uterino

CICUAL Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales para Laboratorio

Cl Claudina

Cont Continuará

DAPI 4'-6-diamidino-2-fenilindol

ENaC Canales epiteliales de Na<sup>+</sup>

HRP Immobilon quimio luminiscente de peroxidasa de rábano

H<sub>2</sub>O dd Agua desionizada

DG Día de gestación

GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

LOAEL Dosis más baja con efectos adversos observables

MAGUK Guanilato quinasas asociadas a membrana

ME Matriz extracelular

NP 40 Nonyl phenoxyethoxyethanol

NTP Programa Nacional de Toxicología

PBS Solución Salina Amortiguada por Fosfatos

PVDF Polifluoruro de vinilideno

Rpm Revoluciones por minuto

SDS Dodecilsulfato de sodio

SI Sitio de implantación

SIN Sitio de no implantación

SOP Síndrome de ovario poliquístico

TBS-T Amortiguador tris salino-tween

TDI Dosis de ingesta diaria tolerable

TEMED Tetrametiletildiamina

UE Unión estrecha

US EPA Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

V Volts

ZO-1 Zonula occludens-1

## **1. Resumen**

El ser humano durante toda su vida se encuentra expuesto a diferentes sustancias que pueden alterar de alguna manera su sistema. Tal es el caso del Bisfenol-A (BPA), el cual es un disruptor endócrino. Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) los disruptores endócrinos son agentes exógenos al organismo que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión o eliminación de hormonas naturales transportadas por la sangre que están presentes en el cuerpo y son responsables de la homeostasis, reproducción y procesos de desarrollo. El BPA se encuentra distribuido ubicuamente en el ambiente producto de la su alta producción, consumo y una subsecuente introducción al ambiente, por lo que el ser humano está expuesto frecuentemente a este compuesto. Es por eso por lo que ya existen varios estudios en animales y algunos en humanos para conocer los efectos que tiene el BPA sobre el organismo y existe un especial interés en la salud reproductiva.

En el presente trabajo, se les administró a las ratas de la generación F0 dos diferentes dosis (dosis baja de 0.05 mg/kg/día y dosis alta de 20 mg/kg/día) de BPA durante la gestación temprana y hasta el destete de las crías, que fueron la generación F1. Se estudió el efecto que tuvo la administración perinatal del BPA sobre la expresión de la proteína de adhesión focal (Paxilina) y uniones estrechas (Claudina-1, 3, 4, 7 y ZO-1) en los úteros de las ratas de la generación F1 que llegaron a etapa adultas y se encontraban gestando.

Las proteínas se obtuvieron de un raspado del útero de la rata, donde están las células epiteliales, que posteriormente se lisaron para tener proteínas libres. Se separaron mediante SDS-PAGE y se cuantificó su expresión por Western-Blot revelando la reacción por quimioluminiscencia. Finalmente se realizó el análisis estadístico de los resultados con la ayuda de un software.

Se observan cambios en la expresión de algunas proteínas (Paxilina, ZO1, Cl-1, Cl-3, Cl-4 y Cl-7) en las distintas muestras para los días 1, 3, 6 y 7 de la gestación de las hembras F1, lo que puede alterar la forma en que el útero interacciona con el blastocisto impidiendo su implantación e invasión, con lo que no se tiene una gestación exitosa.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Bisfenol-A

El bisfenol A o BPA es un compuesto que se obtiene de la condensación del fenol con acetona en presencia de una resina de intercambio iónico ácida, en forma de gel, como catalizador (Riesewijk, et al., 2003).

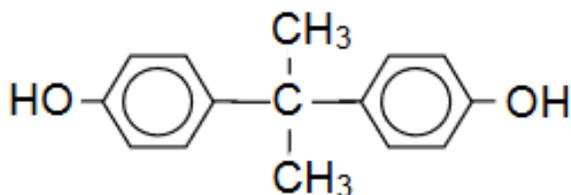


Fig 1. Bisfenol A (BPA).

Es un disruptor endócrino que se encuentra en el ambiente. Su actividad estrogénica se conoce desde los 1930s y a partir de 1950s se utiliza como un componente en la manufactura de plásticos policarbonatos, resinas epóxicas, selladores dentales, así como muchos otros productos (Wadia, et al., 2013). En la síntesis de muchas resinas es necesaria la condensación del BPA con epiclorhidrina y se obtiene diglicidil éter de BPA. Cuando hay una polimerización incompleta, residuos de BPA pueden ser liberados desde la resina. Incluso con exposición a altas temperaturas y soluciones ácidas o básicas se pueden liberar cantidades de BPA de recubrimientos o plásticos, aun cuando la polimerización esté completa y se ha detectado BPA en el suero humano de neonatos y adultos, líquido amniótico, placenta, leche materna y en la orina (Vandenberg, et al., 2010). La exposición se puede dar cuando las moléculas de BPA polimerizadas, que están unidas por enlaces éster son susceptibles a la hidrólisis, que puede ser acelerada cuando la temperatura aumenta y también por el contacto con sustancias ácidas o básicas.

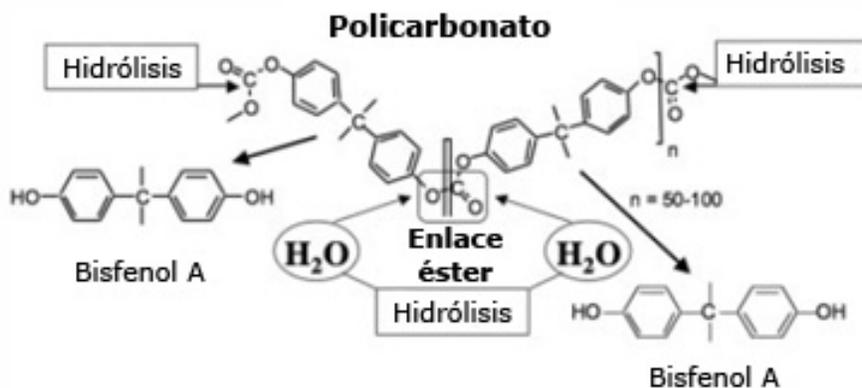


Fig 2. Hidrólisis de BPA polimerizado.

## **2.2 Efectos del BPA sobre los organismos**

El BPA es considerado un estrógeno débil porque tiene una menor afinidad al receptor de estrógenos que el estradiol y además en varios ensayos es 10,000-100,000 veces menos potente que el estradiol (Vandenberg, Hauser, Marcus, Olea, & Welshons, 2007). Pero existen estudios que demuestran que el BPA puede estimular la respuesta de las células a bajas concentraciones (Welshons, Nagel, & vom Saal, 2006). El BPA tiene una producción total que excede los 6 billones de libras en el 2003. Esto lo hace uno de los componentes químicos que se producen en mayor volumen (Burrige, 2003).

Se tienen estudios en los que se describen los efectos de dosis baja de BPA en animales, como es el incremento de peso de la próstata, así como cáncer en la glándula mamaria y próstata, cambios en la organización de glándulas mamarias, inducción de proteínas en el útero, alteraciones en el hipotálamo, un inicio temprano del ciclo estral y la pubertad, peso corporal alterado, malformaciones genitales, entre otras alteraciones (Richter, et al., 2007). En varios estudios la dosis utilizada está por debajo de la dosis de referencia o dosis de ingesta diaria tolerable (TDI) que es de 50 µg/kg de peso corporal/día. Existe la hipótesis que la exposición a disruptores endócrinos durante etapas tempranas del desarrollo, como lo es el BPA, puede causar un incremento en la incidencia de infertilidad, anormalidades en el tracto genital, y cáncer de mama, esto observado en la población europea y estadounidense desde hace más de 50 años (Muñoz-de-Toro, et al., 2005; Sharpe & Skakkebaek, 1993; Skakkebaek, et al., 1998).

En humanos existen menos estudios de los efectos de la exposición al BPA en la salud, pero se ha asociado su presencia en sangre con varias condiciones en las mujeres incluyendo obesidad, hiperplasia endometrial, abortos espontáneos, cariotipos anormales y síndrome de ovario poliquístico (Vandenberg, Hauser, Marcus, Olea, & Welshons, 2007).

La sensibilidad a los disruptores endócrinos como el BPA, puede variar dependiendo en la etapa de vida en la que se esté. Puede alterar el programa epigenético de los genes y resultar en cambios persistentes que se pueden expresar más tarde durante la vida.

Es por eso por lo que la exposición al BPA en las etapas prenatales y/o neonatales puede resultar en cambios en próstata, testículos, glándulas mamarias, tamaño del cuerpo, la estructura y la química del cerebro, y hasta el comportamiento (Vom Saal, et al., 2007).

### **2.3 Cambios en la salud reproductiva**

Exponer al organismo a este tipo de sustancias durante la etapa perinatal puede tener consecuencias a largo plazo, especialmente en el desarrollo del tracto reproductor (Diamanti-Kandarakis, et al., 2009; Newbold, Jefferson, & Padilla-Banks, 2009). Algunas de estas consecuencias se pueden detectar inmediatamente después de la exposición y persisten a lo largo de la vida del animal, y otras no se pueden detectar hasta que llega el organismo a la edad adulta (Richter, et al., 2007). El BPA administrado a hembras gestantes puede pasar en 30 min de la madre al feto (Uchida, et al., 2002), activando receptores de estrógeno (Kim, Han, Yoo, Lee, & Park, 2001), y pudiendo causar anomalías endócrinas y/o reproductivas.

Los humanos se exponen comúnmente por la vía oral, pero también por exposición transdérmica por bañarse con agua contaminada con BPA o por contacto con el papel térmico de las cajas registradoras o por inhalación, estas dos últimas rutas escapan del primer paso de la conjugación del BPA. Un punto de especial preocupación es las altas concentraciones de BPA detectadas en la sangre del cordón umbilical, en el suero materno durante la gestación y en el líquido amniótico durante las etapas de desarrollo en las cuales puede existir una gran sensibilidad (Welshons, Nagel, & vom Saal, 2006).

El útero de roedores es un blanco para las hormonas sexuales esteroideas. Durante el ciclo estral, el útero presenta cambios en su morfología incluyendo una alta proliferación de epitelios luminal y glandular desde el metaestro al día del proestro, seguido por la degeneración por apoptosis del epitelio durante el día del estro. Estos eventos ocurren por los cambios en los niveles de hormonas esteroideas. Es por esto por lo que el útero ha sido un excelente modelo para estudios del efecto estrogénico del BPA (Mendoza-Rodríguez, et al., 2011).

Estudios en animales han mostrado que una exposición de BPA en útero puede producir efectos adversos en diferentes tejidos (Richter, et al., 2007).

La exposición prenatal afecta el desarrollo del cerebro, diferenciación sexual, comportamiento social y ansiedad, y el aprendizaje/memoria (Kundakovic & Champagne, 2011).

Cuando la hembra está expuesta algún fármaco, estrés, y a disruptores endócrinos durante el embarazo se puede alterar la programación epigenética de los genes en el cerebro y contribuir a deficiencias en el desarrollo neurológico de la descendencia (Mueller & Bale, 2008; Novikova, et al., 2008; Skinner, Anway, Savenkova, Gore, & Crews, 2008).

Varios estudios han vinculado la exposición gestacional o neonatal al BPA a cambios prolongados en la metilación del ADN y en la alteración de la expresión génica en los tejidos no neuronales (Kundakovic, et al., 2013).

## **2.4 Infertilidad**

La infertilidad es un problema significativo en la sociedad actual, afectando al 15% de las parejas en edad reproductiva (Fritz & Speroff, 2011). Varios factores influyen en la generación de este problema, como la incidencia de enfermedades de transmisión sexual, por el estilo de vida y la toma de decisión tardía para procrear.

El incremento global de la industria ha expuesto a los humanos a una variedad de compuestos químicos, como ftalatos, parabenos, bisfenol A, triclosán entre otros, los cuales se encuentran en una gran variedad de productos de uso diario (Karwacka, Zamkowska, Radwan, & Jurewicz, 2017). Estos compuestos se han identificado como disruptores endócrinos y se han propuesto como una de las distintas exposiciones en el ambiente responsables de la disminución de la fertilidad (Crain, et al., 2008).

Datos en humanos y animales sugieren que los disruptores endócrinos posiblemente tienen un impacto adverso en la salud reproductiva (Crain, et al., 2008) y puede que jueguen un papel importante en la patogénesis de la infertilidad (Mendola, Messer, & Rappazzo, 2008).

El BPA es capaz de modular el balance hormonal, por lo que puede afectar el proceso de la reproducción.

El número de estudios en el efecto del BPA en la reproducción humana es relativamente bajo (Tomza-Marciniak, Stępkowska, Kuba, & Pilarczyk, 2017). Se tienen más análisis en modelos con animales.

Con la hipótesis de que el BPA como compuesto que altera la regulación hormonal puede contribuir a la infertilidad en la mujer, se midió la concentración de BPA en el plasma sanguíneo de mujeres fértiles e infértiles. Se encontró que la concentración fue dos veces más alta en las mujeres infértiles que en las fértiles (10.6 contra 4.8 ng mL<sup>-1</sup>) (La Rocca, et al., 2014).

En fertilizaciones *in vitro* en 137 mujeres, hubo una dosis-respuesta lineal entre la concentración de BPA urinario y la falla en la implantación (Ehrlich, et al., 2012b). Además, se ha visto que mujeres en tratamiento de fertilización *in vitro* que tuvieron altas concentraciones de BPA urinario produjeron menos ovocitos (recuento de ovocitos en metafase 2 y el número de ovocitos fertilizados) y también se indicó una asociación entre la concentración de BPA urinario y la disminución en la formación del blastocisto (Ehrlich, et al., 2012a).

También el efecto negativo del BPA en la recuperación de ovocitos y el desarrollo potencial de ovocitos humanos depende de varios factores, como la edad y la raza/etnia de las mujeres (Fujimoto, et al., 2011).

La exposición al BPA afecta la función reproductiva en ratones hembra y algunos efectos pueden ser transgeneracionales (Ziv-Gal, Wang, Zhou, & Flaws, 2015).

En una exposición neonatal al BPA (5, 50 y 500 µg/50 µL; inyección subcutánea), causó no solamente cambios en la secreción de estradiol, testosterona y progesterona en ratas adultas Sprague-Dawley, también incrementó la ocurrencia del Síndrome de ovario poliquístico (SOP) y disminuyó la fertilidad en un grupo tratado con 50 µg/50 µL, e infertilidad total en el grupo tratado con la dosis más alta (Fernández, Bourguignon, Lux-Lantos, & Libertun, 2010).

#### **2.4.1 BPA y su efecto en el útero.**

El BPA se ha relacionado con anomalías en la morfología del útero y endometriosis. En estudios de ratones BALB/c en gestación, que fueron sometidas a tratamiento con BPA durante la gestación y 7 días después del parto, se observó que las que recibieron el tratamiento con BPA tuvieron una mayor hipertrofia del endometrio que los animales control. La incidencia de las estructuras similares a la endometriosis fue en 30% del grupo que recibió 0.1 mg BPA/kg de peso corporal y un 35% del grupo que recibió 1 mg BPA/kg de peso corporal, mientras solo en un caso se encontró en el control (Signorile, et al., 2010).

En otros estudios en roedores se ha demostrado que el BPA puede interferir con el crecimiento de los ovarios con dosis baja y alta, pudiendo contribuir al desarrollo de quistes ováricos (Santamaría, Durando, Muñoz de Toro, Luque, & Rodríguez, 2016).

Cuando el BPA fue administrado a ratas en su agua (1.2 mg/kg/día) durante la gestación y la lactancia, se observó que hubo un incremento significativo en el grosor del epitelio uterino y estroma en la progenie adulta (Mendoza-Rodríguez, et al., 2011). La mayoría de la progenie expuesta al BPA tuvo una reducción en la apoptosis epitelial y una regulación negativa de la expresión del receptor a estrógeno  $\alpha$  en células epiteliales durante el estro (Mendoza-Rodríguez, et al., 2011).

Estudios *in vitro* muestran que el BPA en otras células endometriales parece inducir diferentes efectos. De hecho, se observó un decremento en la proliferación en fibroblastos endometriales de humanos aislados de muestras de histerectomía (Aghajanova & Giudice, 2011) y en células endoteliales del endometrio (Bredhult, Sahlin, & Olovsson, 2009).

Hay un número creciente de reportes que sugiere que la exposición al BPA puede conducir al fallo de la receptividad uterina. Se observó un menor índice de embarazo y una reducción en el número de los sitios de implantación en ratas administradas con BPA durante la primera semana postnatal (Varayoud, et al., 2011). Y puede existir una influencia en el éxito de la implantación ante la exposición al BPA. En realidad, se ha observado que las mujeres con BPA urinario alto, tienen mayor fallo en la implantación durante los tratamientos *in vitro* (Ehrlich, et al., 2012b).

Una enfermedad que podría desarrollarse en mujeres por el efecto del BPA es el Síndrome de ovario poliquístico (SOP), manifestándose como una alteración del metabolismo y reproducción, así como la falta de ovulación e hiperandrogenismo. Esta enfermedad se caracteriza por un desorden en el proceso de la foliculogénesis y está relacionado con la ocurrencia de infertilidad. La concentración de BPA en el suero de mujeres con SOP fue significativamente más alta ( $p < 0.05$ ) que con las que no padecían esta enfermedad (1.05 contra 0.71 ng/mL) (Takeuchi, Tsutsumi, Ikezuki, Takai, & Taketani, 2004).

Estudios en fibroblastos del endometrio estromal de humanos, que se sometieron a concentraciones altas de BPA (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) por 48 h, tuvieron una proliferación disminuida (Aghajanova & Giudice, 2011). Se ha visto que el BPA actúa negativamente en las células epiteliales del endometrio, disminuyendo la proporción de la proliferación de una manera dependiente de la dosis y tiempo (Bredhult, Sahlin, & Olovsson, 2009).

#### **2.4.2 BPA y su efecto en la gestación.**

Algunos estudios han demostrado que la exposición a disruptores endócrinos, que imitan la actividad de hormonas esteroideas, pueden afectar el crecimiento fetal y la diferenciación de los órganos (Hardin, et al., 1981; Kim, et al., 2001).

Existen varios estudios epidemiológicos que han considerado los efectos potenciales de la exposición prenatal al BPA en la salud reproductiva. Se ha reportado que niños de 50 madres con exposición ocupacional al BPA durante la gestación, determinado por mediciones de muestras de aire, tuvieron un menor peso al nacer que 444 niños cuyos padres no tenían exposición ocupacional al BPA (Miao, Yuan, Zhu, He, & Li, 2011).

Se ha relacionado con una reducción de la maduración de los ovocitos, y a efectos adversos en el lactante y en el niño, que incluyen un mayor riesgo de parto prematuro, preeclampsia, acortamiento de la duración de la gestación y medidas antropométricas bajas al nacer (Cantonwine, Ferguson, Mukherjee, McElrath, & Meeker, 2015; Giulivo, Lopez de Alda, Capri, & Barceló, 2016; Pinney, et al., 2017; Snijder, et al., 2013).

Existe un transporte de BPA a través de la placenta hacia el feto. El feto muy probablemente esté expuesto al BPA libre, y como el hígado del feto no está desarrollado completamente no puede protegerlo de la constante exposición al compuesto (Balakrishnan, Henare, Thorstensen, Ponnampalam, & Mitchell, 2010).

#### **2.4.3 BPA y su efecto en la implantación del blastocisto.**

Principalmente influye en el desarrollo del útero en el periodo perinatal y en la etapa de implantación. Se encontró que el BPA cambia la receptividad del endometrio al embrión en esa etapa de implantación (Xiao, Diao, Smith, Song, & Ye, 2011).

El proceso de implantación requiere del desarrollo sincronizado del embrión y del endometrio, cuando el BPA interviene en la receptividad del endometrio al embrión en la etapa de implantación, no es claro si también influye en el desarrollo del blastocisto antes de la implantación, conduciendo a la pérdida de la capacidad intrusiva de los blastocistos en el endometrio.

Un ejemplo el efecto del BPA en la implantación se tiene en el estudio donde se utilizaron inyecciones subcutáneas de 10 mg/kg/día de BPA en ratones gestantes y se inhibió la implantación del embrión (Xiao, Diao, Smith, Song, & Ye, 2011).

En otra investigación se administró BPA por vía oral a ratones en gestación y se encontró que la gestación terminó a la ingesta diaria de 68.84 mg de BPA (Berger, Hancock, & deCatanzaro, 2007).

Por otra parte, el BPA influye en la mitosis y en el desarrollo del ovocito. Un estudio donde se administró por vía oral 20, 40 o 100 µg BPA/kg de peso corporal, a ratones hembra por 6-8 días antes de la obtención de los ovocitos, se encontró que el BPA afecta la mitosis de acuerdo con la dosis, y a dosis bajas durante las etapas finales en el crecimiento del ovocito son suficientes para causar efectos indeseables (Hunt, et al., 2003). Varios estudios in vitro han demostrado que la exposición al BPA causa la degeneración del ovocito alterando la meiosis, y se ha sugerido que el BPA pudiera alterar el progreso de la profase en la mitosis, tal como el proceso de emparejamiento, sinapsis y recombinación, así como la supervivencia el ovocito (Briño-Enríquez, et al., 2011).

La exposición crónica al BPA causa efectos adversos en la implantación y en el establecimiento de la gestación (Li, Davila, Bagchi, & Bagchi, 2016). En estudios sobre el mecanismo del BPA en modificar la habilidad de invasión de los trofoblastos humanos, que juegan un papel importante durante la implantación del embrión, se estableció que el número de células invasivas con el tratamiento de BPA a 0.01, 1 y 100  $\mu\text{M}$  disminuyen al 0.04, 16.48 y 49.92%, respectivamente en comparación con el control (Wang, et al., 2015). En ratones C57BL6 se ha demostrado los efectos adversos de dosis alta de BPA en el transporte del embrión, desarrollo de la preimplantación y establecimiento de la receptividad uterina. Por ejemplo, en el grupo de ratones tratados con dosis subcutáneas de 100 mg BPA/kg/día, no se detectaron implantaciones en el día 4.5, mientras que se observó la retención de embriones en el oviducto y desarrollo retrasado del embrión (Xiao, Diao, Smith, Song, & Ye, 2011).

Resultados similares se tuvieron, donde se indicó que una sola exposición a dosis altas de BPA disminuye la efectividad de implantación en ratones (Berger, Shaw, & deCatanzaro, 2008). En ratas también hay resultados parecidos, en un caso se ha observado que la exposición en el periodo neonatal causa daño a las paredes uterinas, lo que obligó a un menor número de lugares posibles para la implantación de ovocitos fertilizados durante la pubertad de las hembras (Varayoud, et al., 2011).

## **2.5 Uniones estrechas (UE)**

Las capas de epitelio constituyen una frontera entre el organismo y el ambiente externo. La existencia de compartimentos en el organismo con diferentes características en los epitelios es posible por la presencia de las uniones estrechas. Estas proteínas se encuentran en la parte superior de la membrana lateral, delimita a las células epiteliales y funcionan como un sello que regula el paso de iones, agua, y moléculas a través del espacio paracelular, también mantienen la distribución polarizada de proteínas y lípidos en la membrana plasmática. Estas moléculas (UE) parecen estar organizadas como un grupo de proteínas transmembranales acopladas a otras proteínas submembranales, que actúan como puentes, conectando el complejo a la actina del citoesqueleto.

Las claudinas (Cl's) forman parte de este tipo de proteínas, están involucradas en la determinación de la permeabilidad epitelial. Otra proteína es ZO-1 que pertenece a una familia de proteínas llamadas guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK) y se caracteriza por estar formada por varios dominios, varios de ellos con interacción específica proteína-proteína.

Es considerada como una proteína de andamiaje que trae proteínas estructuralmente diversas, pero funcionalmente conectadas, a la unión estrecha más cercana (Mendoza-Rodríguez, González-Mariscal, & Cerbón, 2005). ZO-1 está concentrada en el lado citoplasmático en células epiteliales simples unido al filamento de unión estrecha. Los complejos de ZO forman un enlace entre los filamentos de unión estrecha y la activa citoplasmática. Fue localizada en la región apical de la membrana plasmática lateral de células del epitelio uterino, seguramente enlazando los filamentos con la actina del citoesqueleto en células del epitelio uterino (Orchard & Murphy, 2002).

Estudios *in vitro* han mostrado que ocludina (también forma parte de este grupo de proteínas) interacciona con otras proteínas de las uniones estrechas, ZO-1, ZO-2 y ZO-3 que unen la ocludina a la actina del citoesqueleto (Furuse, et al., 1994; Haskins, Gu, Wittchen, Hibbard, & Stevenson, 1998). Las claudinas contribuyen a las propiedades de adhesión y barrera y son también responsables de la formación de filamentos de las uniones estrechas.

### **2.5.1 Uniones estrechas durante la gestación**

Las uniones estrechas regulan el paso de solutos por la vía paracelular e imparten polaridad a las células epiteliales separando los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. El número de filamentos en la red de unión estrecha y el número de interconexiones determina la hermeticidad de la barrera formada por esta red (Claude & Goodenough, 1973). Estas proteínas están bajo la influencia de hormonas ováricas.

El epitelio uterino es alterado cíclicamente por hormonas ováricas que regulan su capacidad para permitir la implantación del blastocisto, y después es invadido periódicamente desde su superficie por el blastocisto en la implantación.

Altos niveles de estrógeno en el proestro y en el día 1 de gestación (DG1) resulta en una red de filamentos paralelos a la superficie apical con pocos filamentos verticales conectándose con los orientados horizontalmente (pocas interconexiones) (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982). Como hay edema en el estroma en este día, el movimiento de fluido del estroma al lumen uterino requiere que las uniones estrechas no formen una barrera perfecta para la difusión de fluido y de pequeñas moléculas a lo largo de la vía paracelular en la gestación temprana, y la morfología es consistente con lo visto (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982).

En las ratas, las células trofoblásticas del blastocisto empiezan a formar proyecciones a las células del epitelio uterino después de la fijación inicial a la superficie apical del día 6 de gestación (DG 6) (Schlafke & Enders, 1975). Este proceso indica que el complejo de unión que abarca la vía paracelular entre las células del epitelio uterino son modificadas para preparar las condiciones en las que las células trofoblásticas penetren.

Existen también cambios en la morfología de las uniones estrechas que sugiere que la red de uniones estrechas se vuelve más eficiente en bloquear la vía paracelular para preservar el contenido líquido luminal uterino (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982).

En el DG 6, que es cuando se da la implantación del blastocisto, la red de uniones aumenta 3 veces en profundidad a lo largo de la membrana plasmática lateral y también se hace mucho más complejas en estructura, con muchas interconexiones entre filamentos, que consiste en arreglos ramificados (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982).

Pareciera que el incremento de la complejidad y "estrechez" morfológica vista durante la gestación temprana, es un reflejo de la necesidad de mantener el contenido luminal especialmente fabricado por la secreción epitelial para el desarrollo del blastocisto, y así evitar la dilución o pérdida por un flujo no deseado fuera o dentro del lumen (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982).

Como los desmosomas (Illingworth, et al., 2000), uniones adherentes y la red terminal se pierden al tiempo de la implantación (Murphy, 2000a), las uniones estrechas pueden ser las únicas uniones que dan las propiedades de adhesión y de barrera a las células del epitelio uterino.

En mujeres, las uniones estrechas son geométricamente más complejas en etapas más tempranas que en las tardías en el ciclo menstrual (Murphy, Swift, Need, Mukherjee, & Rogers, 1982; Murphy, Rogers, Hosie, Leeton, & Beaton, 1992). En todas las especies donde hay suficiente evidencia, se apunta a que la progesterona induce un incremento en la complejidad de las uniones estrechas (Murphy, 2000b).

### **2.5.2 Inmunohistoquímica de uniones estrechas en las células del epitelio uterino de la rata durante la gestación temprana.**

En un estudio realizado en la Facultad de Química de la UNAM (Martínez-Peña, et al., 2017) se investigó si la administración de BPA durante el periodo perinatal en dosis baja (0.05 mg/kg/día, grupo BPA-B) o alta (20 mg/kg/día grupo BPA-A) tiene efecto en la inmunotinción y localización de ZO-1 y claudinas-1, 3, 4 y 7 en células de epitelio uterino (CEU) de ratas en los días 1, 3, 6 y 7 de gestación (DG 1, 3, 6 y 7) (Figuras 3-6 y Tabla 1).

En el grupo de ratas control se observó que la expresión de ZO-1 y las claudinas estudiadas varía con el tiempo durante la gestación. De esta manera, en el DG 1, ZO-1 se localizó en la parte apical de la membrana lateral (Fig. 3A). Durante el DG 3 y 6 la distribución de ZO-1 cambió, localizándose a lo largo de la membrana basolateral (Fig. 4A y 5A).

En el DG 7, ZO-1 se localizó de nuevo en la parte apical, aunque en una menor intensidad de tinción (Fig. 6A). Las claudinas-1 y -3 mostraron un pico de expresión en el día 3 (Fig. 3D y G) mientras que claudina-4 se expresa a partir del día 6 en el sitio de implantación (Fig. 3J). En los otros días estudiados la inmunotinción fue menor. También se encontró que la expresión de la claudina-7 en el día 7 (Fig. 6M) es menor que en los días 1 y 3 (Fig. 3M y 4M). Estas observaciones indican que a medida que la gestación avanza, la distribución y la expresión de ZO-1 y las claudinas estudiadas sufren cambios significativos. A continuación, se describe los cambios que se observaron en la expresión y localización de estas proteínas entre el grupo control y los tratados con BPA.

Tabla 1. Expresión y localización de las proteínas de uniones estrechas en células de epitelio uterino (CEU) durante la gestación temprana:

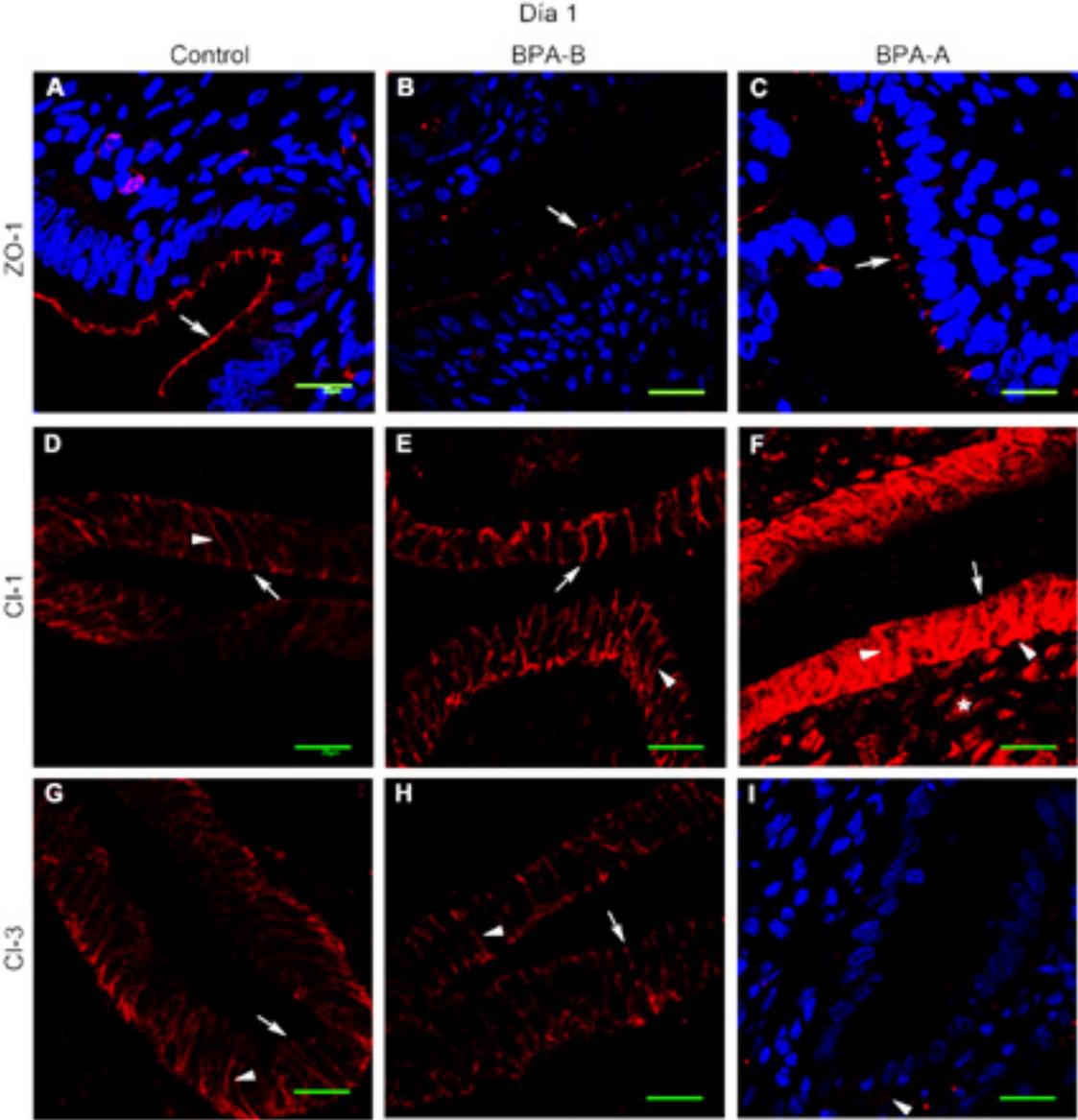
<b>DG 1</b>		<b>Control</b>	<b>BPA-B</b>	<b>BPA-A</b>
	ZO-1	+++parte superior	+parte superior	++puntual
	Claudina-1	+lateral	++lateral	+++basolateral
	Claudina-3	+lateral	+lateral	+basal
	Claudina-4	--	+basolateral	--
	Claudina7	+++basolateral	+mitad inferior	+++basolateral
<b>DG 3</b>				
	ZO-1	+++basolateral	+puntual	++parte superior
	Claudina-1	++lateral	+lateral	+++lateral
	Claudina-3	+++lateral	+lateral	++lateral
	Claudina-4	--	+basolateral	+basolateral
	Claudina7	+++basolateral	+mitad inferior	+++basolateral
<b>DG 6</b>				
<b>SI</b>	ZO-1	++tercio superior	+++tercio superior	+parte superior
	Claudina-1	++mitad inferior	++mitad inferior	+++mitad inferior
	Claudina-3	+lateral	+lateral	+lateral
	Claudina-4	+basolateral	++basolateral/ +estroma citoplasmático	+puntual

Cont.

<b>DG7</b>				
<b>SI</b>	ZO-1	+puntual	+parte superior	+puntual
	Claudina-1	+lateral	--	++lateral
	Claudina-3	+lateral/++estroma citoplasmático	--/+estroma citoplasmático	--
	Claudina-4	--/+estroma citoplasmático	--	--/+estroma citoplasmático
	Claudina7	++basolateral	+++basal	++basolateral

Basal, porción basal de la membrana; Basolateral, porción basolateral de la membrana; Lateral, porción lateral de la membrana; mitad inferior, mitad inferior de la membrana lateral; Puntual, puntual en la porción superior de la membrana lateral; Parte superior, parte superior de la membrana lateral; tercio superior, tercio superior de la porción lateral de la membrana; estroma citoplasmático, tinción citoplasmática de células del estroma. DG, día de gestación; SI, sitios de implantación. No hay tinción (--), baja tinción (+), tinción moderada (++), tinción intensa (+++).

**Día 1 de gestación (DG1).**



Cont.

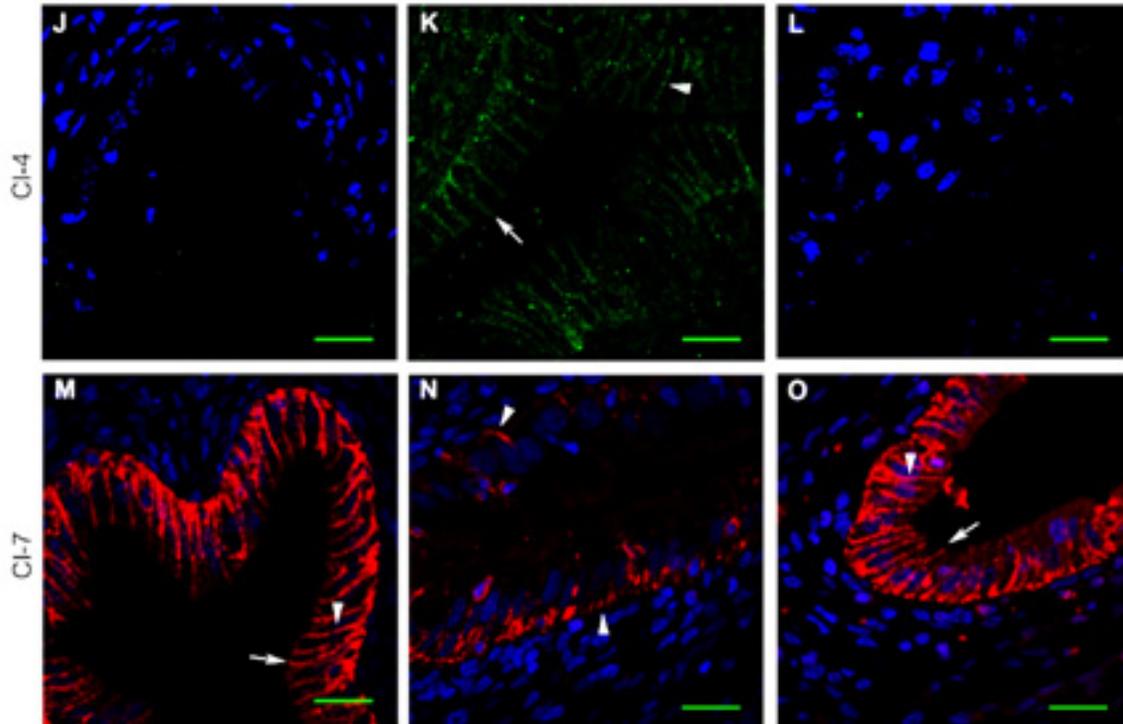
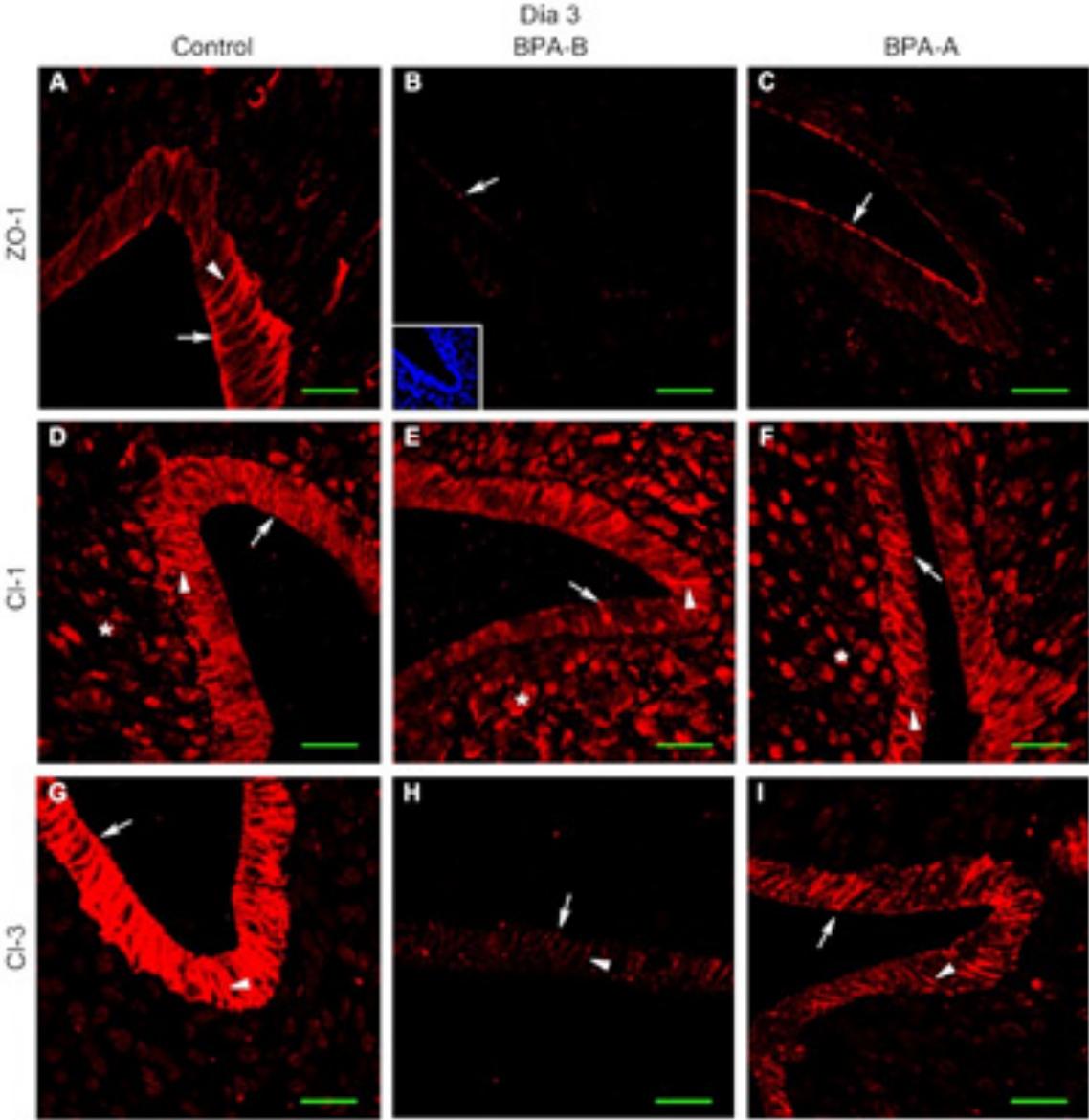


Fig 3. Inmunolocalización de las proteínas de las UE en las CEU en animales control y tratados con BPA al día 1 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 $\mu$ m. En los paneles A-C, I, J, L, y M-O también se muestran los núcleos teñidos con DAPI.

Las comparaciones se hicieron con respecto al control. ZO-1 tuvo una tinción menor en el grupo BPA-B respecto al grupo control (Figura 3B y Tabla 1), mientras que en el grupo BPA-A ZO-1 presentó una tinción intermedia y distribución puntual (Figura 3C y Tabla 1). La Cl-1 incrementó su tinción conforme aumentó la dosis de BPA (Figura 3E, F y Tabla 1), y en Cl-3 se observó lo contrario, esta fue disminuyendo la intensidad de la tinción (Figura 3H e I). Cl-4 solo se detectó en BPA-B (Figura 3K y Tabla 1) y en este tratamiento Cl-7 se observó disminuida su intensidad (Figura 3N y Tabla 1).

**Día 3 de gestación.**



Cont.

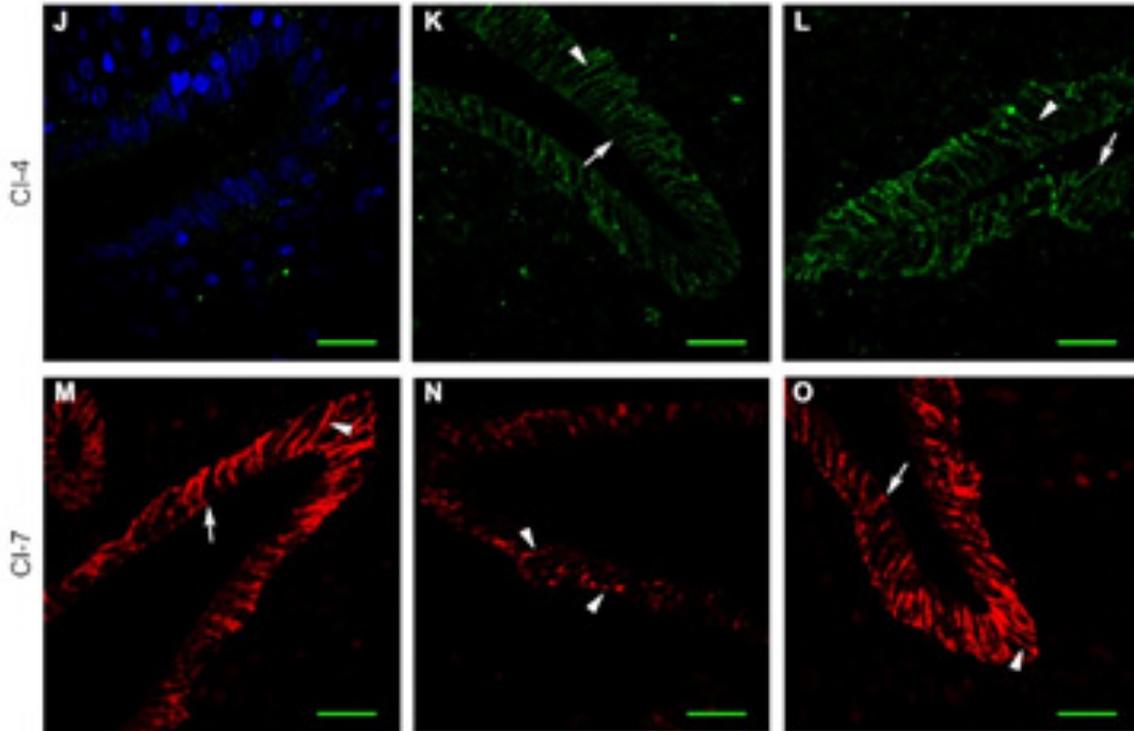
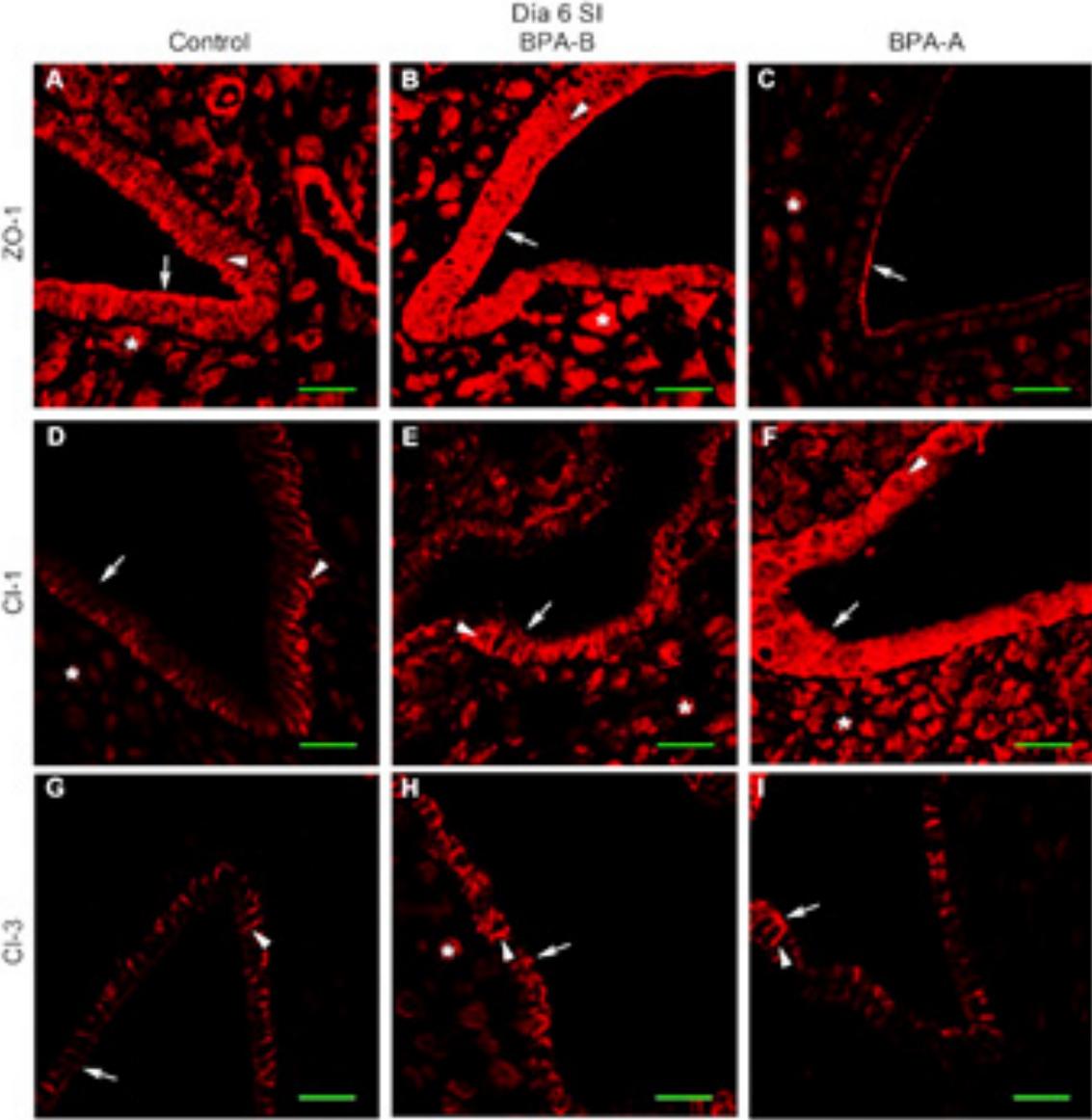


Fig 4. Inmunolocalización de las proteínas de las UE en las CEU en animales control y tratados con BPA al día 3 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 $\mu$ m. En los paneles B y J también se muestran los núcleos teñidos con DAPI.

La señal de ZO-1 en el grupo BPA-B (Figura 4B y Tabla 1) casi no se percibe, pero en BPA-A es más evidente esta señal, que se localiza en la parte superior de la membrana celular (Figura 4C y Tabla 1). La intensidad de la tinción de Cl-1 en el grupo BPA-B se ve disminuida respecto al grupo control y al BPA-A (Figura 4E y Tabla 1). Para la Cl-3, los dos tratamientos de BPA indujeron una disminución en la tinción respecto al grupo control, siendo más evidente en la dosis baja (Figura 4H, I y Tabla 1). No se detecta señal de Cl-4 en el grupo control (Figura 4J y Tabla 1), pero ya en los tratamientos de BPA-B y BPA-A (Figura 4K, L y Tabla 1) se observó señal para esta proteína. La intensidad de la tinción para Cl-7 fue menor en el grupo BPA-B (Figura 4N y Tabla 1) respecto a los grupos control y BPA-A (Figura 4M, L y Tabla 1).

**Día 6 de gestación (SI)**



Cont.

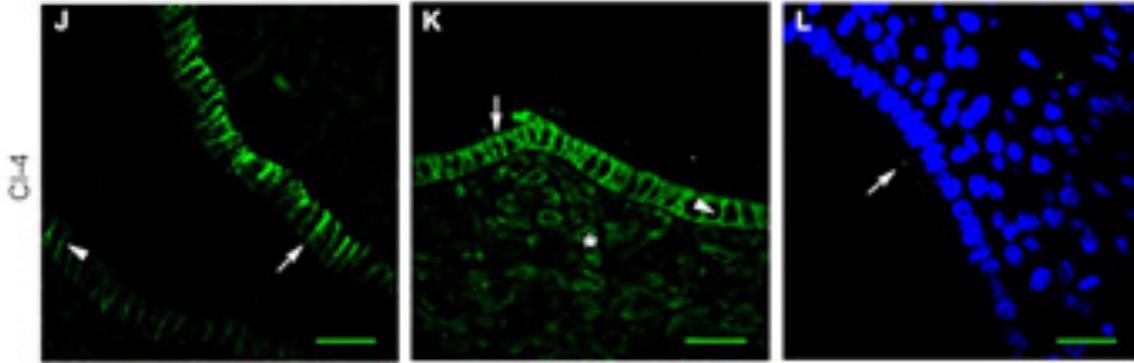
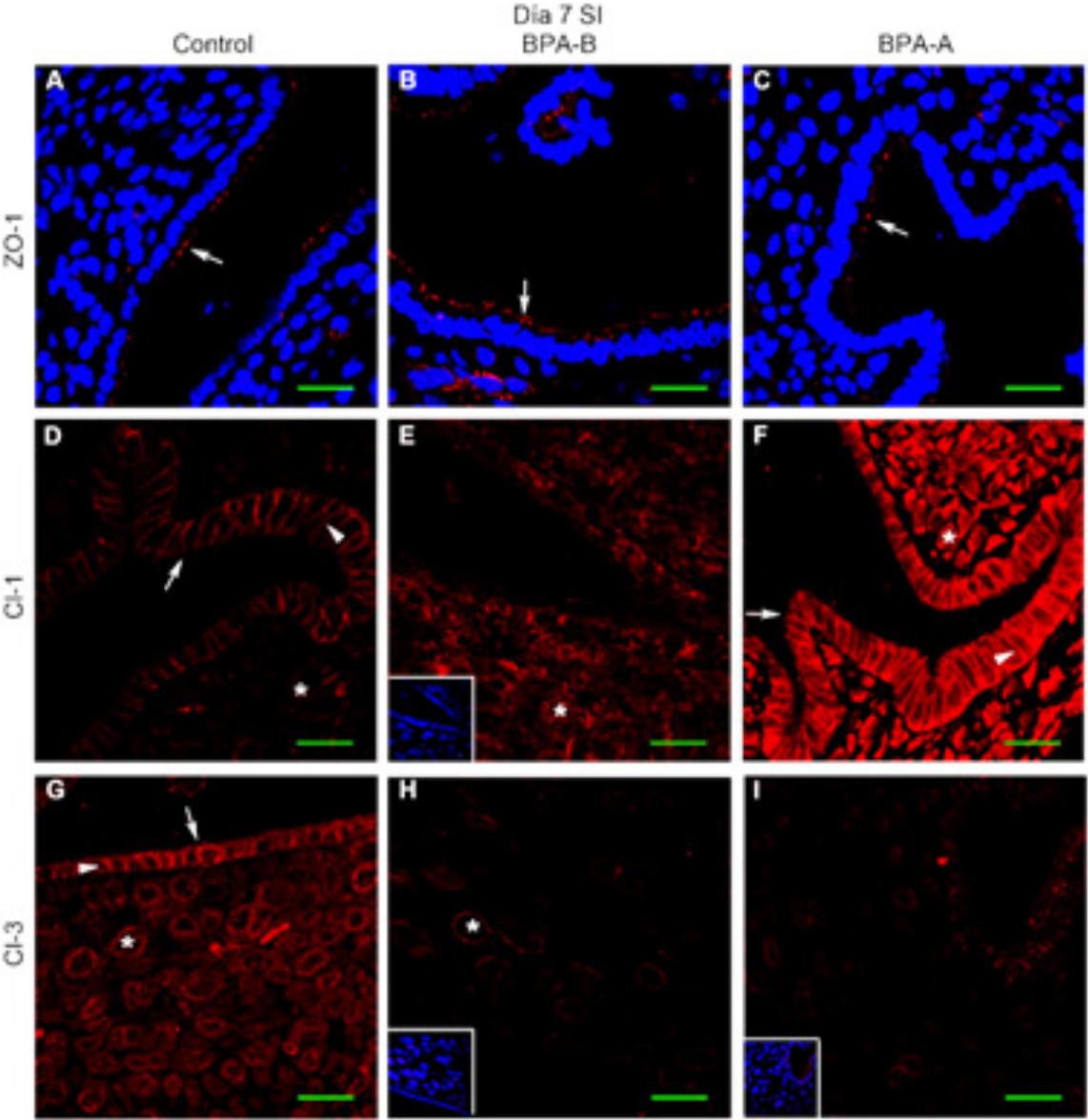


Fig 5. Inmunolocalización de las proteínas de las UE en las CEU de SI en animales control y tratados con BPA al día 6 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20μm. En el panel L también se muestran los núcleos teñidos con DAPI.

En el grupo BPA-B se observó una mayor intensidad en la tinción lateral de ZO-1 respecto al grupo control (Figura 5B y Tabla 1) mientras que en el grupo BPA-A ZO-1 se concentró en la región superior de la membrana lateral (Figura 5C y Tabla 1). La tinción de Cl-1 en la membrana lateral y en el citoplasma se detectó incrementada en el tratamiento de BPA-B y BPA-A respecto al grupo control (Figura 5E, F y Tabla 1). Cl-3 presentó una señal apenas detectable en los dos tratamientos y en el control (Figura 5G-I y Tabla 1). La tinción de CL-4 se observó por primera vez en el grupo control, donde se localizó en la membrana basolateral llegando hasta el extremo apical, al igual que el grupo de BPA-B (Figura 5J, K y Tabla 1).

También se localizó en el citoplasma de células del estroma (Figura 5K \* y Tabla 1) y en BPA-A se presentó una tinción muy baja en la parte apical de la membrana lateral de las CEU (Figura 5L y Tabla 1).

**Día 7 de gestación (SI)**



Cont.

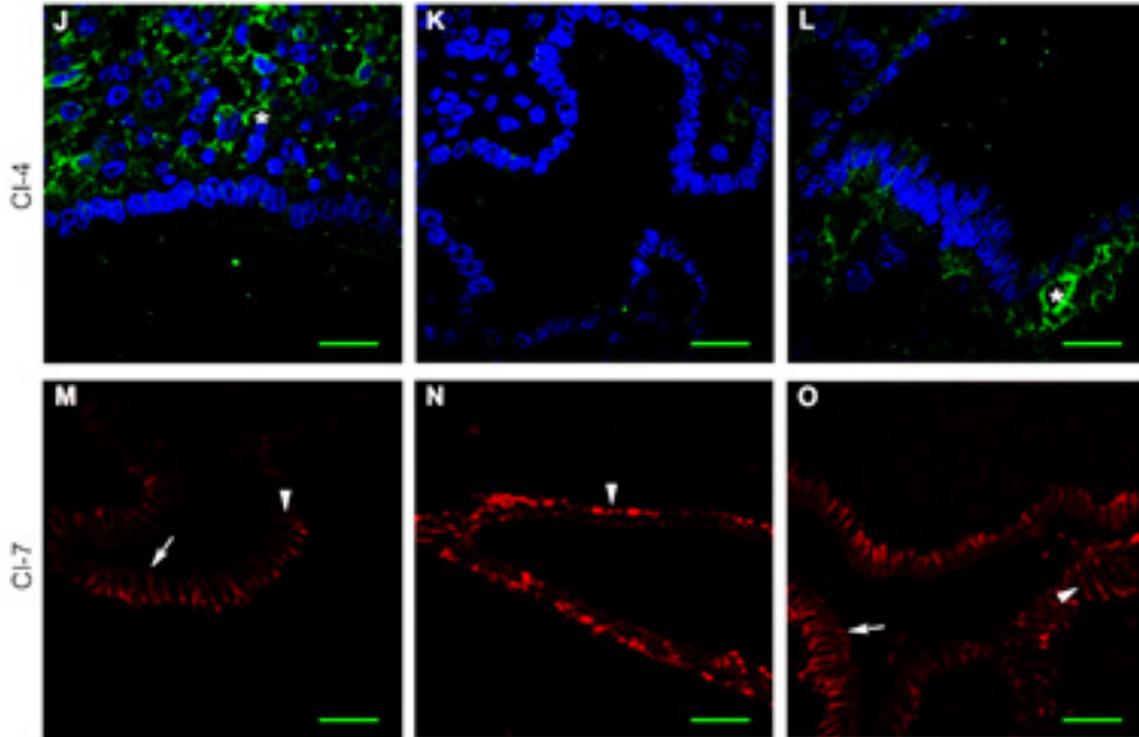


Fig 6. Inmunolocalización de las proteínas de las UE en las CEU de SI en animales control y tratados con BPA al día 7 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 $\mu$ m. En los paneles A-C, E y H-L también se muestran los núcleos teñidos con DAPI.

Durante este día el grupo de BPA-B presentó un incremento en la señal de ZO-1 (Figura 6B y Tabla 1). Para CI-1 en el grupo BPA-B, se observó una tinción citoplasmática difusa y en BPA-A incrementó la señal en la zona basolateral (Figura 6E, F y Tabla 1). Los dos tratamientos de BPA redujeron la señal de CI-3 (Figura 6H, I y Tabla 1). El tratamiento con BPA-A disminuyó la señal citoplasmática de CI-4 en las células del estroma, mientras que en BPA-B no se presentó la señal (Figura 6K, L y Tabla 1). Así mismo, el tratamiento con BPA-B incrementó la tinción de CI-7 (Figura 6N y Tabla 1).

## 2.6 Adhesiones focales (AF)

Las adhesiones focales (AF) consisten en un número de proteínas de tipo estructural y de señalización que vincula la matriz extracelular (ME) con la actina intracelular del citoesqueleto. Además, están involucradas en la modulación de numerosos procesos biológicos. En el embarazo temprano, estas proteínas están a lo largo de la superficie basal de células del epitelio luminal del útero de rata. Cuando llega el tiempo de la implantación, las proteínas de las adhesiones focales como talina, paxilina, integrina  $\beta 1$  y  $\beta 3$  son desmontadas del sitio de adhesión focal, permitiendo que las células del epitelio luminal sean menos adherentes al estroma y facilitar así su separación para promover la invasión del embrión (Diamanti et al. 2009).

Tabla 2. Resumen de los resultados de los grupos de tratamiento del Bisfenol-A sobre la expresión de la proteína de adhesión focal: Paxilina, en el útero de ratas durante la gestación temprana.

	Control	BPA-B	BPA-A
Día 1	Basal + Apical + Lateral +	Basal ++ Apical +++ Lateral++	Basal + Apical ++ Lateral+
Día 3	Basal ++ Apical ++ Lateral+	Basal + Apical ++ Lateral+	Basal + Apical ++ Lateral+
Día 6	Basal + Apical +++ Lateral+	Basal ++ Apical ++++ Lateral+	Basal ++ Apical ++++ Lateral++
Día 7	Basal no Apical ++ Lateral++	Basal ++ Apical ++ Lateral+	Basal no Apical + Lateral+

Dónde: +: tinción escasa; ++: tinción moderada; +++: tinción media; ++++; no: no se presentó tinción.

### 2.6.1 Inmunohistoquímica de la proteína de adhesión focal paxilina en las células del epitelio uterino de la rata durante la gestación temprana.

En un estudio realizado en la Facultad de Química de la UNAM se investigó si la administración de BPA durante el periodo perinatal en dosis baja (0.05 mg/kg/día, grupo BPA-B) o alta (20 mg/kg/día grupo BPA-A) tiene efecto en la inmunotinción y localización de la proteína paxilina, la cual forma parte de las adhesiones focales (Méndez Carrillo, 2016).

## Día 1 de gestación.

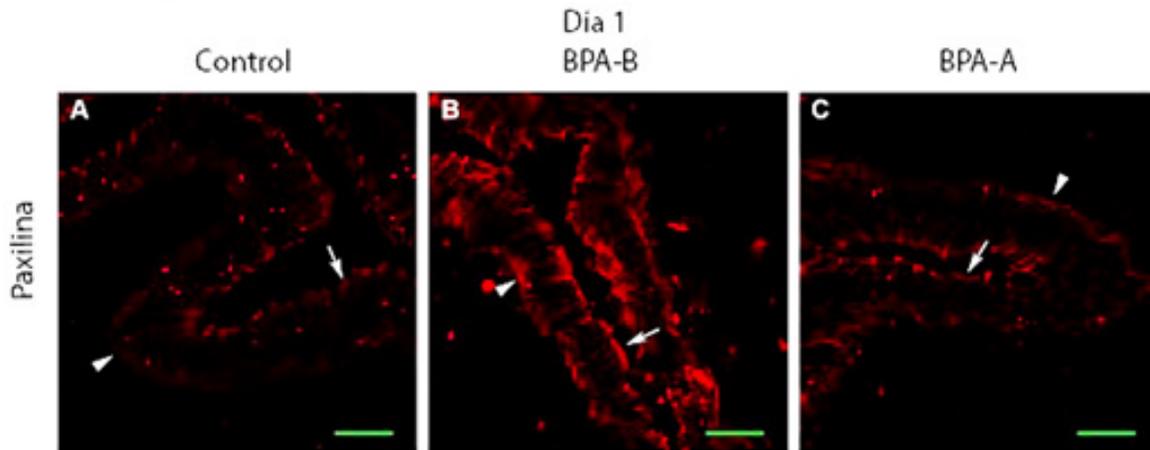


Fig 7. Inmunolocalización de las proteínas de las AF en las CEU en animales control y tratados con BPA durante el día 1 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 $\mu$ m.

El día 1 corresponde al siguiente de apareamiento. En este día (Figura 7 y Tabla 2), Paxilina se localizó a lo largo de las regiones basal (punta de la flecha) y apical (flecha) de las CEU, en todos los grupos tratados. Los tratamientos con BPA mostraron mayor tinción en la región apical (flecha) que, en el control, siendo BPA-B en la que se observó una tinción más intensa en la región apical (Figura 7B y Tabla 2). En la región basal (punta de la flecha) el grupo de BPA-B (Figura 7B) mostró mayor tinción con respecto al control (Figura 7A).

### Día 3 de gestación.

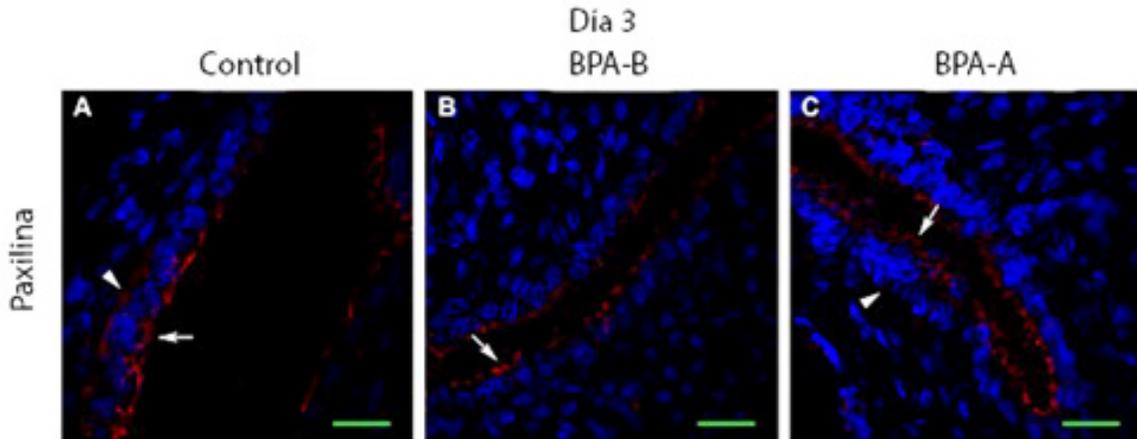


Fig 8. Inmunolocalización de las proteínas de las AF en las CEU en animales control y tratados con BPA durante el día 3 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 $\mu$ m. En los paneles A-C también se muestran los núcleos teñidos con DAPI.

Día de gestación 3 (Figura 8 y Tabla 2), la tinción de Paxilina en la región basal (punta de la flecha) y apical (flecha) aumentó con respecto al grupo control del día anterior (Figura 7), sin embargo, la tinción de esta proteína se vio reducida en los grupos BPA-B (Figura 8B) y BPA-A (Figura 8C) con respecto al día anterior con sus respectivos tratamientos (Figura 7). Se mantuvo una tinción similar en todos los tratamientos en la región lateral.

## Día 6 de gestación

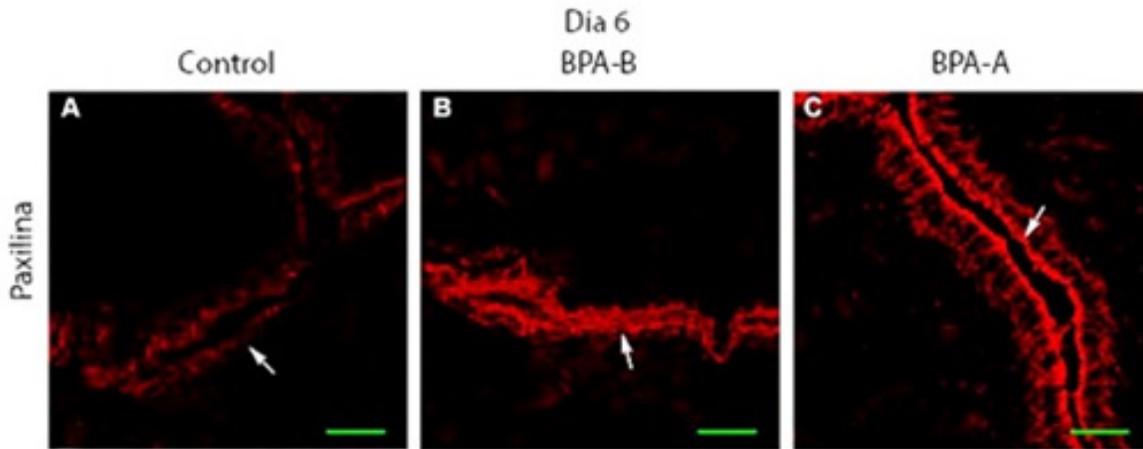


Fig 9. Inmunolocalización de las proteínas de las AF en las CEU en animales control y tratados con BPA durante el día 6 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 $\mu$ m. En los paneles D-F también se muestran los núcleos teñidos con DAPI.

El momento de la implantación es el día 6 (Figura 9 y Tabla 2), en el grupo control se detectó una disminución de la presencia de Paxilina en la membrana basal (punta de la flecha) de las CEU (Figura 9A) respecto a este mismo grupo en el día 3 (Figura 8A). En cambio, en ambos grupos con BPA (Figura 9B, C y Tabla 2), se observó un incremento en la tinción basal (punta de flecha) respecto a este mismo grupo en el día 3 (Figura 8 y Tabla 2). Además, esta tinción basal (punta de la flecha) fue mayor en los grupos tratados con BPA respecto a la tinción del grupo control en este mismo día (Figura 9 B, C y Tabla 2).

La tinción en la región apical (flecha) de las CEU en el grupo control durante el día 6 (Figura 9 y Tabla 2) aumentó con respecto a ese mismo grupo en el día 3 (Figura 8). Por otra parte, los grupos tratados con BPA (Figura 9B, C y Tabla 2), presentaron un aumento en la expresión de Paxilina en la región apical (flecha) con respecto al grupo control (Figura 9A). Así mismo, todos los tratamientos expresaron escasa tinción de la proteína en la región lateral (Figura 9 y Tabla 2).

## Día 7 de gestación.

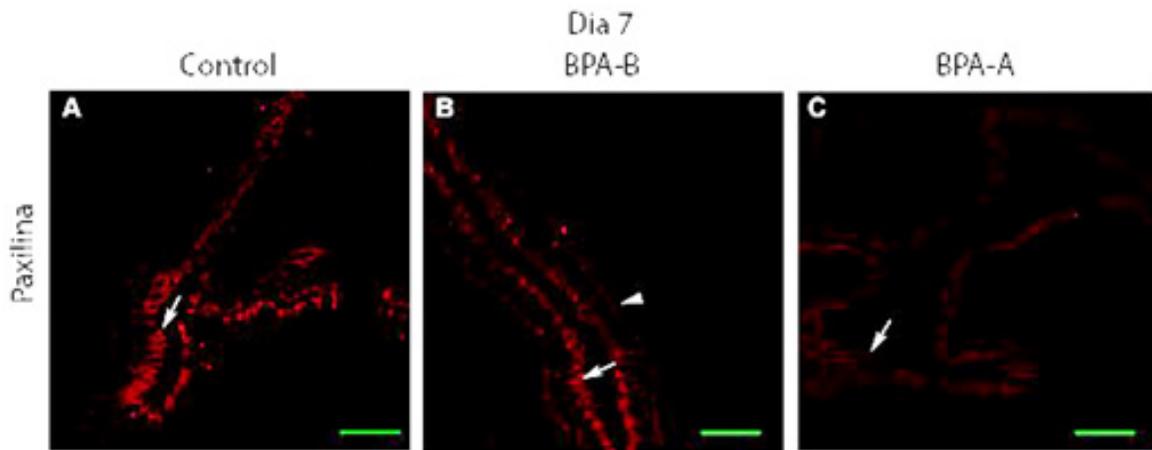


Fig 10. Inmunolocalización de las proteínas de las AF en las CEU en animales control y tratados con BPA durante el día 7 de la gestación. El tratamiento que tuvo cada grupo se especifica en la parte superior de las columnas y la proteína detectada en la parte izquierda de cada fila. Control, animales control; BPA-B, BPA dosis baja; BPA-A, BPA dosis alta. Las flechas indican la localización de la proteína en la parte apical de la membrana lateral de las CEU, y las puntas de flecha indican la localización en la membrana lateral. Barra= 20 $\mu$ m.

En el día 7 el blastocisto penetra hacia el estroma. En este día, los grupos control y BPA-A (Figura 10A y C), no se detectó la presencia de Paxilina en la membrana basal en las CEU, pero si en el tratamiento con BPA-B (Figura 10B).

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 día 6 (Figura 9 y Tabla 2).

En el día 7 la intensidad de la señal fue similar en los grupos control y BPA-B (Figura 10B), y disminuyó en el tratamiento BPA-A (Figura 10C). Se observó presencia de la proteína en la membrana lateral de las CEU en todos los grupos, presentando una menor expresión en los grupos tratados con BPA (Figura 10B y C) respecto al control (Figura 10A).

## **2.7 Importancia de las proteínas UE y AF en la gestación**

La implantación del blastocisto es un evento complejo y coordinado que solo pasa durante un estricto periodo de tiempo, este se conoce como ventana de implantación. La eliminación de células del epitelio luminal uterinas que están en contacto con el blastocisto es importante para facilitar proliferación de células del trofoblasto en ratas (Kaneko, Murphy, & Day, 2014).

La implantación inicia con la unión del blastocisto al epitelio uterino, seguido de su penetración y continua con una invasión controlada de las células trofoblásticas en la decidua que se desarrolla del estroma endometrial. Este proceso requiere de cambios en el endometrio para un éxito en la gestación, que es regulada por hormonas ováricas, así como señales embrionarias. Normalmente las células epiteliales no permiten la adhesión de otras células a la superficie apical, esto hace que la unión epitelio uterino-trofoblasto sea un caso único. Las proteínas de las uniones estrechas juegan un rol esencial y pueden ser afectadas durante los cambios epiteliales y deciduales. Se encuentran en la parte apical del complejo de unión, que constituye el borde entre los compartimentos de la membrana apical y basolateral, manteniendo la polaridad apico-basal de las células epiteliales. Algunas claudinas, que forman parte de las uniones estrechas, tienen una mayor expresión en la implantación en el día 4.5 de embarazo en ratones, esto sugiere que tienen un papel importante para la implantación del blastocisto (Schumann, Buck, Classen-Linke, Wennemuth, & Grümmer, 2015).

Las adhesiones focales juegan un papel importante al momento de la implantación, donde alguna de las proteínas principales como Paxilina son desarmadas del sitio de las adhesiones focales con el propósito de promover la invasión del embrión.

Entonces para que la implantación se realice de manera exitosa, el endometrio sufre de cambios drásticos de tipo morfológico y molecular para que se dé la implantación del blastocisto, estos cambios son conocidos como la transformación de la membrana e involucran la expresión y activación de diferentes moléculas.

### **3. Planteamiento del problema**

La infertilidad humana es una problemática que ha estado aumentando durante los últimos años, como consecuencia se abre el campo de la investigación para poder entender cuáles son los posibles agentes causales de esta condición. Un grupo de estos agentes causales son los llamados disruptores endócrinos que tiene la característica de provocar cambios en el organismo, y por consecuencia ocasionar problemas en la reproducción humana.

### **4. Hipótesis**

La exposición de ratas a diferentes dosis de BPA durante el periodo perinatal provocará que cuando estos animales lleguen a etapa adulta y queden gestantes se presenten cambios en la expresión de las proteínas de uniones estrechas y adhesiones focales del epitelio uterino de las ratas, evaluada esta expresión por western-blot.

### **5. Objetivo general**

Determinar el efecto de la administración durante el periodo perinatal de bisfenol-A sobre la expresión de proteínas de las adhesiones focales y uniones estrechas en el útero de la rata durante la gestación temprana.

#### **5.1 Objetivos particulares**

- Obtener muestra del tejido uterino de ratas adultas que estuvieron expuestas al BPA durante la gestación y lactancia.
- Cuantificar la expresión de proteínas de las adhesiones focales (paxilina) y uniones estrechas (ZO-1, Cl-1,-3, -4 y -7) después de ser expuestas al BPA por medio de Western-Blot.
- Comparar los resultados con las inmunohistoquímicas de las proteínas en cortes histológicos de útero de ratas que tuvieron el mismo tratamiento, procedentes de trabajos previos en el laboratorio.

## **6. Metodología y Material**

### **6.1 Animales**

El manejo y cuidado de los animales se hizo con base en las directrices de la Ley Mexicana de Protección Animal y con la aprobación del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales para Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM. Las ratas de cepa Wistar se obtuvieron del centro UNAM-Harlan. Se mantuvieron bajo un ciclo de 12:12 h luz:oscuridad con comida y agua del grifo ad libitum. Se hizo un monitoreo del ciclo estral de las ratas (n=48) con un frotis vaginal, para seleccionar las que tuvieran ciclos regulares.

#### **6.1.1 Tratamiento de la generación F0**

Fueron seleccionadas 21 ratas para ser apareadas. Se detectó la gestación de los animales al observar espermatozoides en el frotis vaginal que se realizó después de la monta del macho. Este día corresponde al DG 1. A estas ratas se les agrupó dependiendo de si se les administró una dosis baja de BPA (BPA-B) que fue de 0.05 mg/kg/día, dosis alta de BPA (BPA-A) que fue de 20/mg/kg/día o el grupo control que solo recibió el vehículo. Para el BPA, la dosis más baja con efectos adversos observables (LOAEL) por vía oral en ratas es de 50 mg/kg/día, como determinó la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA). El Programa Nacional de Toxicología (NTP) sugiere una dosis de corte de 5 mg BPA/kg/día para la clasificación de efectos con dosis baja, independientemente de la ruta de administración, duración de la exposición, o la edad/etapa de vida en la cual la exposición ocurra (Melnick, et al., 2002).

La dosis de BPA-B es 100 veces menor que la dosis baja de corte sugerida por el NTP y similar a la dosis segura o al nivel aceptable de ingestión (ADI) establecida por US EPA. Mientras que la dosis de BPA-A es cuatro veces más alta que la dosis baja de corte sugerida por el NTP y 2.5 veces más baja que la LOAEL determinada por US EPA. El BPA fue pesado de acuerdo con el peso de la rata, se disolvió en etanol absoluto y se agregó al agua en botellas de vidrio que bebió cada rata. El grupo control solamente tomó agua con etanol al 0.1%. Los tratamientos se dieron del día 6 de gestación hasta el día 21 postnatal.

### **6.1.2 Tratamiento de F1**

En el día 21 postnatal, se destetaron a los animales y las hembras fueron separadas, se dejaron llegar a una edad adulta (hasta los 3 meses de edad). Después del destete, ya no se les administró BPA, ellas estuvieron expuestas al BPA solamente durante la gestación y la lactancia. Una vez que llegaron a etapa adulta se les monitoreó el ciclo estral y se aparearon con machos de fertilidad comprobada. Se estableció el día 1 de gestación por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal el día siguiente al apareamiento. Se sacrificaron las hembras de cada tratamiento en el día 1, 3, 6 y 7 de gestación. Y se hizo la disección de ambos cuernos uterinos de cada.

### **6.2 Determinación de los sitios de implantación**

Se determinaron los sitios de implantación del blastocisto en el útero de las ratas en los días 6 y 7 de gestación. Para ello, se inyectó azul de Evans por vía intravenosa 30 min antes de que se sacrificaron a las ratas. En estas zonas aumenta la vascularización con respecto a otras áreas del útero. Es por eso que en estos sitios se tiñen con el colorante.

### **6.3 Extracción de proteínas**

Se preparó amortiguador de lisis (PBS 1%, NP 40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidor de proteasas 1%) para colocar 200  $\mu$ L en cada microtubo. Se hizo un raspado del endometrio uterino con una hoja de bisturí, en cada sitio de implantación de la muestra de tejido uterino de alguna rata seleccionada y la hoja es limpiada con el amortiguador. Se usó una diferente hoja de bisturí entre cada tratamiento.

Ya con la muestra en el amortiguador de lisis se hicieron 30 pases de la solución por con una jeringa de 1 mL, cambiando de jeringa en cada muestra. Las muestras se sonicaron por 3 min (30 s on-20s off 35%), y se centrifugaron a 14,000 g por 20 min a 4°C.

## 6.4 Cuantificación de proteínas

### 6.4.1 Bradford

Se preparó la siguiente curva patrón:

Tabla 3. Preparación de la curva patrón para la cuantificación de proteínas.

$\mu\text{g}$ BSA	$\mu\text{L}$ BSA (1mg/mL)	$\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O dd	$\mu\text{L}$ Reactivo de Bradford
0	0	10	200
0.5	0.5	9.5	200
1	1	9	200
2	2	8	200
3	3	7	200
4	4	6	200
5	5	5	200

El reactivo de Bradford se preparó al momento, haciendo una dilución de 1 mL Bradford (Bio-Rad) + 4 mL de agua desionizada. Se mezcló y se filtró la disolución. En una placa con 96 pozos se colocaron los volúmenes especificados en la Tabla 3 de cada reactivo.

Se hicieron diluciones 1:10 de cada muestra de proteína, de esta dilución se tomaron 5  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O dd.

Tanto la curva patrón como las muestras se hicieron por duplicado y ya que se tuvieron preparados todos los pozos al final se agregó el reactivo de Bradford en todos los pozos, se dejó incubar por 5 min y se centrifugó a 1200 rpm para mezclar y quitar las burbujas que se hubiesen formado. La absorbancia de las muestras y de la curva patrón se leyeron en un lector de placas (Epoch, Biotek) a 595 nm.

## 6.5 Western-Blot

### 6.5.1 Preparación de los geles

Primero se colocaron los vidrios bien alineados en el bastidor y se pusieron sobre las juntas y se ajustaron los bastidores en el soporte (Fig. 11). Se hizo una marca 1 cm por debajo del peine, que es el nivel hasta donde llegó el gel separador (Bio-Rad. Instruction Manual, Mini-PROTEAN® Tetra Cell Rev D).

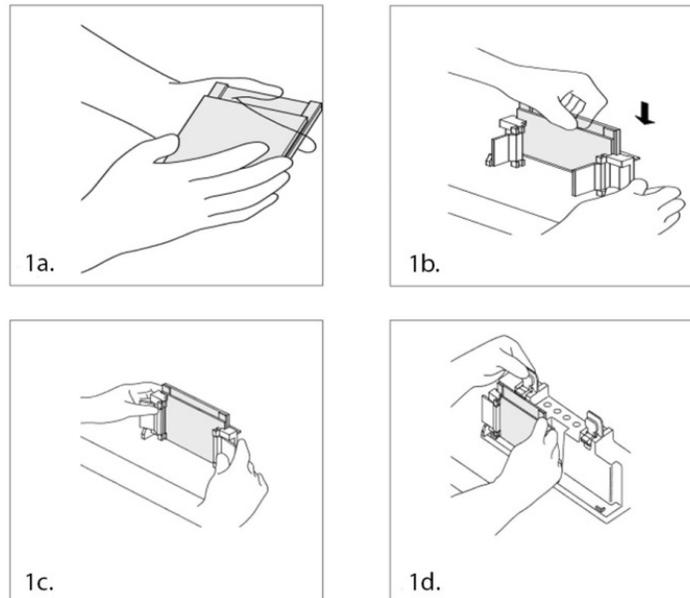


Fig 11. Montaje de vidrios en el bastidor y soporte. Obtenido de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>

En un tubo Falcon se preparó el gel separador (15% para separar las Claudinas u 8% para Paxilina, ver Anexo A) el cual ya mezclado se depositó hasta la marca que se hizo en el vidrio. Se agregó una cantidad suficiente de etanol 80% para cubrir la parte superior del gel para impedir el contacto con el aire y se polimerizará el gel.

Se preparó el gel concentrador (Anexo A), se retiró el etanol, y se agregó el gel concentrador encima del gel separador entre los dos vidrios hasta la parte superior del vidrio corto. Se colocó el peine para diez pozos y se dejó polimerizar.

### 6.5.2 Preparación de las muestras

Se prepararon 9 muestras de proteína para cada gel, las cuales consistían en 3 muestras del grupo control, 3 muestras del tratamiento con dosis baja y 3 muestras del tratamiento con dosis alta. Cada muestra era de diferente rata. Con una micropipeta se tomaron la cantidad en  $\mu\text{L}$  equivalente a  $30 \mu\text{g}$  de proteína de las muestras. Cada muestra se colocó en un microtubo etiquetado y en todo momento se mantuvieron las muestras en hielo. Se agregó amortiguador de carga (Anexo A) en todos los tubos, se mezcló en un vortex y se centrifugaron los tubos. En una parrilla de calentamiento para tubos, se calentaron las muestras a  $95^{\circ}\text{C}$ , por 5 min e inmediatamente se enfriaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . Si hubo residuos de la mezcla se volvieron a centrifugar.

### 6.5.3 Ensamblaje del módulo de electroforesis y carga de muestras.

Se limpió y secó el marco de sujeción (Figura 12, a) y se colocaron los vidrios con el corto mirando hacia dentro (Figura 12, b). Se ajustaron los vidrios hasta el tope superior (Figura 12, c) y se aseguraron con los brazos del marco (Figura 12, d). Ya preparado el marco de sujeción con los vidrios, se colocó en el tanque cuidando que coincidieran la marca roja del tanque con la del marco y la marca negra (Figura 12, f).

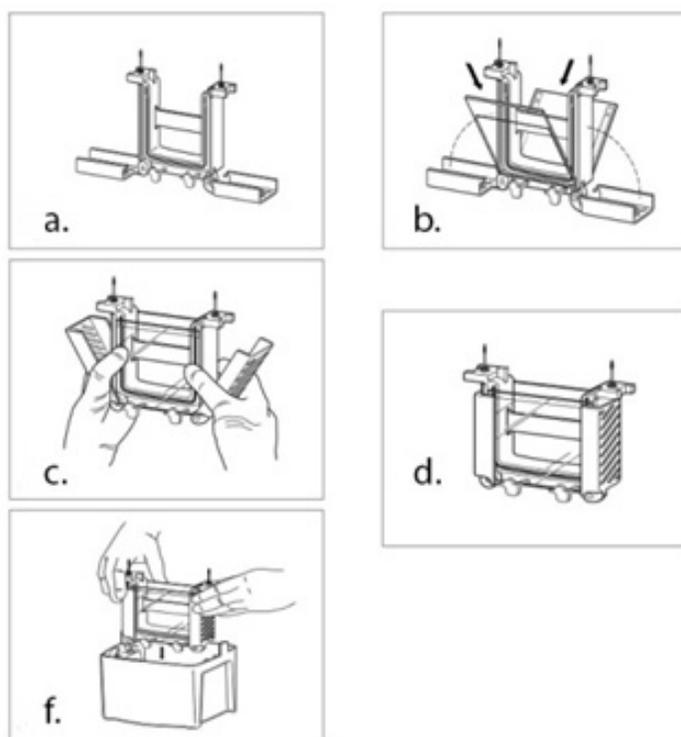


Fig 12. Montaje de vidrios en el marco de sujeción y en el tanque. Obtenido de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>

Se llenó con amortiguador de corrida 2X (ver Anexo A) el espacio entre los dos vidrios y el tanque hasta la marca de 2 geles. Se le dio una sacudida al marco de sujeción para retirar las burbujas formadas en el fondo. Con una micropipeta, se cargaron 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular en el primer pozo, en los nueve pozos restantes se colocaron las muestras de los animales control, de dosis baja y alta. Es importante hacer el cambio de punta entre cada muestra y cargar lentamente para evitar que la muestra se salga de los pozos. La tapa se colocó encima del tanque, de tal forma que los enchufes del marco entren en los conectores de la tapa. Los cables se conectaron a una fuente de poder y se corrió a 60 V hasta que el frente de corrida pasó del gel concentrador al gel separador. Cuando sucedió esto, se puso en pausa la fuente de poder para cambiar el voltaje a 110 V y se continuó el proceso hasta que el frente de corrida llegó al final del gel, sin que salga.

Terminada la electroforesis, se tomaron los geles y se dejaron en un recipiente con amortiguador de transferencia (ver Anexo A) por 15 min.

## 6.6 Transferencia

Los papeles filtro y fibras se equilibraron en un recipiente con amortiguador de transferencia por 20 min. Antes de terminar el tiempo, se trató la membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con metanol por 15 segundos, se enjuagó con agua desionizada por 2 min y se dejó por 5 min en amortiguador de transferencia (Bio-Rad. Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell).

En la Figura 13 se muestra cómo se montaron los componentes en el cassette.

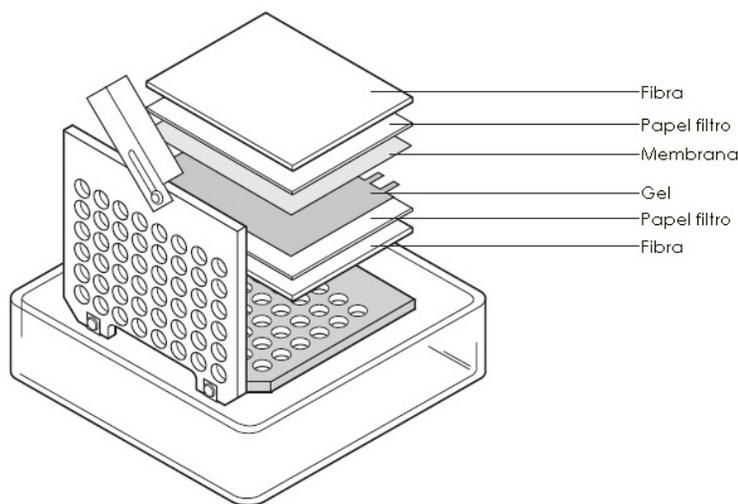


Fig 13. Preparación del sándwich para la transferencia. Obtenido de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>

Cuando se tienen los cassettes preparados, se montaron en un módulo que tiene una parte oscura que coincide con el lado gris del cassette. Dentro del tanque se colocó una barra magnética, se introdujo el módulo junto con los cassettes y se agregó la unidad de enfriamiento. Con todo esto armado se procedió a llenar de amortiguador de transferencia hasta la marca de "blotting". Se estableció la corriente a 110 V por 60 min (Fig 14).

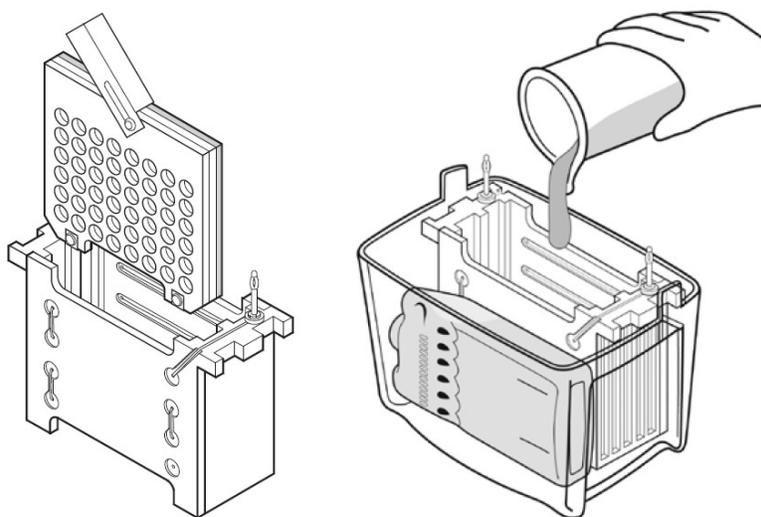


Fig 14. Preparación del tanque para la transferencia y montaje de los cassettes en el módulo. Obtenido de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>

### **6.7 Preparación de anticuerpos y membranas.**

Se prepara solución de bloqueo con amortiguador tris salino-tween (TBS-T) más 10% de leche en polvo descremada. En dos recipientes, se colocaron las membranas en la solución de bloqueo, y se incubaron con agitación constante por 1 hora.

Antes de que terminara el tiempo de incubación, se hicieron las diluciones del anticuerpo primario (Anexo B) contra la proteína de interés: En el caso de anti-GAPDH, se tomaron 0.6  $\mu$ L del anticuerpo y se diluyeron en 7 mL de TBS-T; para anti-ZO-1, anti-CI-1, anti-CI-3, anti-CI-4, anti-CI-7 y anti-Paxilina, se tomaron 2  $\mu$ L del anticuerpo y se diluyeron con 7 mL de TBS-T, cada anticuerpo por separado. Cada membrana fue cortada, tomando en cuenta los marcadores de peso molecular, de manera que una parte se dejó incubando con anti-GAPDH y la otra con el anticuerpo para la proteína de interés. La membrana se dejó incubando con el anticuerpo primario toda la noche con agitación constante.

Al día siguiente, se hicieron 3 lavados de 10 min con TBS-T a cada membrana. Con el anticuerpo secundario (Anexo B) para GAPDH y Claudina-1, 3 y 7 se utilizaron 1.2  $\mu$ L del anticuerpo secundario anti-conejo mezclado con 10 mL de TBS-T para cada uno.

En el caso de Cl-4 se usaron 1.2  $\mu$ L del anticuerpo secundario anti-ratón en 10 mL de TBS-T y para ZO-1 y Paxilina se tomaron 2  $\mu$ L de anticuerpo secundario anti-conejo y se diluyeron en 10 mL de TBS-T.

Se incubaron las membranas que tenían la proteína GAPDH con 10 mL de la dilución del anticuerpo secundario por 1 hora en agitación constante y la otra membrana con la proteína de interés se dejó incubando toda la noche con agitación hasta el siguiente día. Cuando los tiempos de incubación terminaron, se hicieron 3 lavados de 10 min con TBS-T a cada membrana.

### **6.8 Revelado y cuantificación.**

Con la membrana lista, se preparó solución reveladora con el sustrato Immobilon quimioluminiscente de peroxidasa de rábano (HRP, ver Anexo B). Haciendo uso de una micropipeta se cubrió la membrana con la solución reveladora, en el lado en que la membrana estuvo en contacto directo con el gel.

Utilizando el escáner para quimioluminiscencia LI-COR C-DiGit conectado a una computadora y con el software Image Studio Digits Ver 4.0, se hizo el revelado de las membranas colocándolas en la zona de escaneo, así como el análisis.

El software arrojó una imagen con las bandas oscuras que representan las proteínas que buscamos, a partir de las cuales se hicieron las cuantificaciones por densidad óptica.

### **6.9 Análisis de datos**

Los análisis se hicieron con el uso del programa, GraphPad Prism<sup>®</sup>. Con la intención de determinar si los diferentes tratamientos tenían diferencia significativa con respecto al control se hizo un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba Tukey.

## **7. Resultados**

A continuación, se presentan los resultados de la detección de proteínas mediante western-blot (Fig. 15 y Fig. 16). Las imágenes de las bandas corresponden a las membranas que se revelaron por quimioluminiscencia y las gráficas son los resultados que se tienen después de hacer el análisis densitométrico con el programa GraphPad Prism<sup>®</sup>. Los valores de densitométricos que se graficaron se obtuvieron al realizar el cociente de la densitometría que pertenece a la proteína de interés entre la densitometría del gen de expresión constitutiva GAPDH.

### **7.1 Efecto del BPA en los niveles de proteínas de UE en el útero de rata.**

Las imágenes de las membranas reveladas para las proteínas de uniones estrechas ZO1, Cl-1, Cl-3, Cl-4, Cl-7 y GAPDH se muestran en la Figura 15, los tratamientos se comparan siempre con el control.

En el DG 1, el grupo BPA-B presentó una menor expresión de la proteína ZO1, en comparación con el control (Fig. 15A). La cantidad de claudina-1 fue aumentando conforme se incrementó la dosis de BPA. Claudina-3 tuvo una menor expresión en los dos grupos tratados con BPA con respecto al control. En la claudina-4 observamos un comportamiento diferente entre los dos grupos tratados con BPA: mientras que el grupo que fue tratado con la dosis baja se observa una mayor expresión de la claudina-4 respecto al grupo control, el grupo tratado con la dosis alta presentó una expresión similar al control. Para la claudina-7 tenemos una menor expresión de esta proteína en el grupo tratado con dosis baja de BPA, mientras que el grupo BPA-A presenta una expresión similar al control.

La imagen 15B muestra los resultados del DG 3. ZO1 se expresó en menor grado en la dosis baja y en la dosis alta se observó una mayor expresión, comparado con el control. Claudina-1 tuvo una menor expresión en los dos grupos tratados con BPA respecto al control. La banda de claudina-3 tiene una ligera diferencia con el control, presentando en ambos grupos tratados una menor expresión. Hubo un aumento en la expresión de la proteína claudina-4 en la dosis baja y alta, respecto al control. La claudina-7 aumentó su expresión en los dos grupos tratados respecto al control, pero es más evidente en el grupo de la dosis alta.

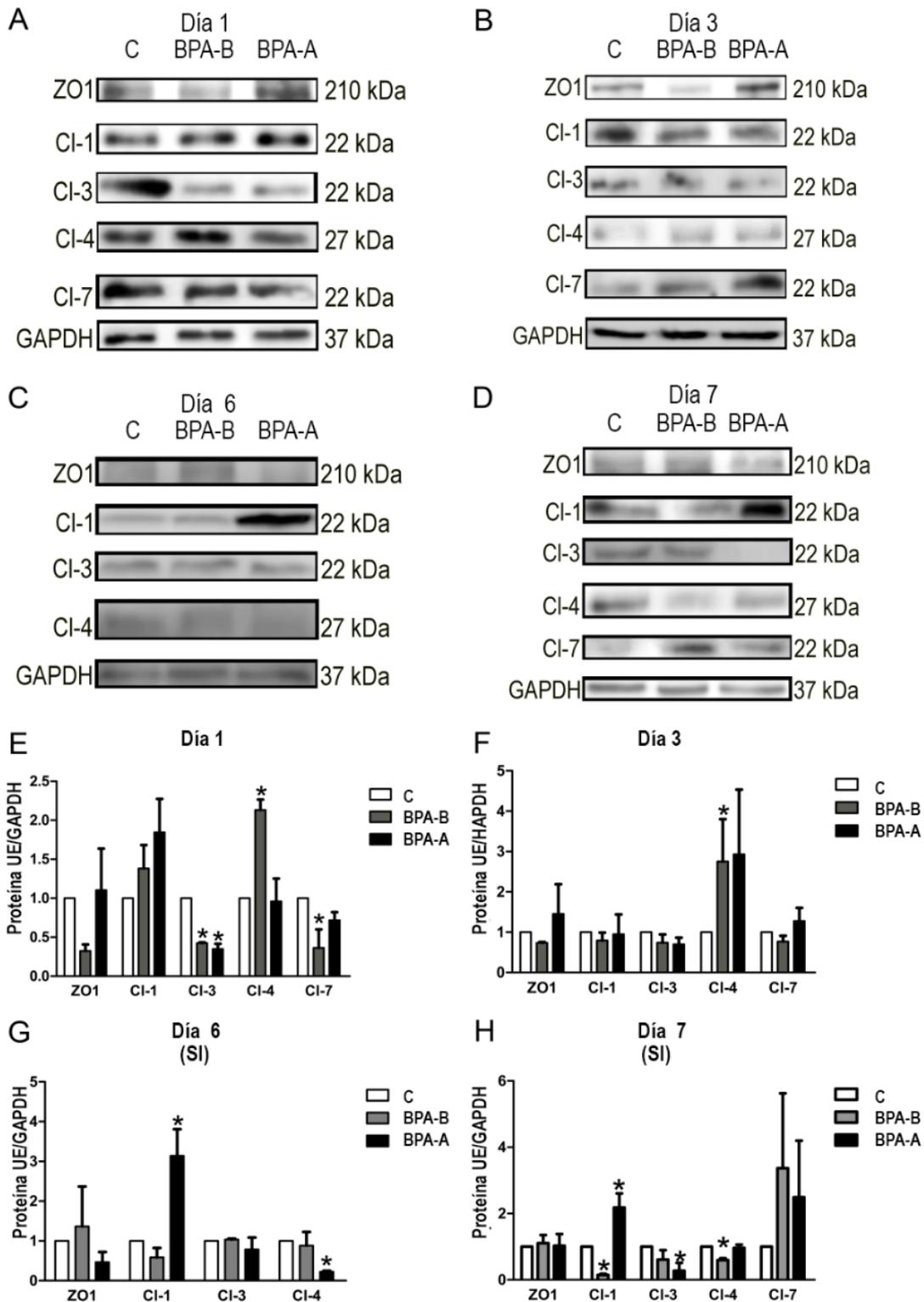


Fig 15. Expresión de proteínas de uniones estrechas durante los primeros días de la gestación, en el útero de ratas control (C) o tratadas perinatalmente con dosis baja (BPA-B) o alta (BPA\_A) de BPA. Resultados representativos de las inmunoréplicas por western-blot de cada una de las proteínas estudiadas (A, B, C y D) y los perfiles densitométricos de los geles (E, F, G y H). A y E, DG 1; B y F, DG 3; C y G, DG 6; D y H, DG 7. \*  $p < 0.05$

El DG 6 se encuentra en la imagen 15C, donde ZO1 aumentó su expresión en BPA-B y en BPA-A pasa lo contrario. Pudimos observar que claudina-1 en el grupo tratado con la dosis baja de BPA se mantuvo similar al control, mientras que el grupo BPA-A se vio un aumento considerable en su expresión. Claudina-3 presentó una expresión similar en los tres grupos. La claudina-4 en el grupo BPA-B mantuvo una expresión similar al control mientras que en el grupo tratado con dosis alta se observó una disminución en la expresión de la proteína. En este día no se detectó a la claudina-7.

Del DG 7, ZO1 mantuvo una expresión similar en los tres grupos estudiados. Claudina-1 presentó una menor expresión en el grupo tratado con la dosis baja y una mayor el grupo tratado con la dosis alta. Lo que observamos para claudina-3 fue el decremento en la expresión en la dosis baja y aún más para la dosis alta. En la banda de claudina-4 del grupo tratado con dosis baja hay poca expresión y en el grupo tratado con dosis alta su expresión es similar a la del grupo control. Para claudina-7 observamos un incremento en la expresión de esta proteína en ambos grupos tratados respecto al control.

El análisis densitométrico de varias réplicas de las membranas mostradas en la Figura 15 nos permitió observar los efectos del BPA en las proteínas de las uniones estrechas. Los gráficos en el eje "x" está el nombre de la proteína de unión estrecha y en el eje "y" el cociente de la densidad óptica de la proteína/densidad óptica de GAPDH, estas se obtienen con un análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism<sup>®</sup>. Las barras que corresponden a dosis baja o alta de BPA se compararon con la del control y con eso pudimos saber si existe una diferencia significativa. Del DG 1 en la Figura 15E, se observó que la proteína claudina-3 presentó una disminución significativa en los dos grupos tratados con dosis diferentes de BPA respecto al grupo control. El grupo BPA-B presentó un aumento significativo en la expresión de claudina-4 y un decremento significativo de la claudina-7, respecto al grupo control.

En el DG 3, Figura 15F, se observó un aumento significativo en la expresión de claudina-4 en el grupo tratado con dosis baja de BPA.

En la Figura 15G, del DG 6, hubo en el grupo BPA-A un incremento significativo en la expresión de claudina-1 y un decremento significativo para claudina-4. En el DG 7, en la Figura 15H, observamos que la expresión de la claudina-1 en la dosis baja presentó un decremento significativo mientras que en la dosis alta es lo contrario, presentando un incremento significativo, ambos respecto al grupo control. Así mismo, observamos que la expresión de la claudina-3 en el grupo con tratamiento de dosis alta, presentó una disminución significativa de su expresión y el grupo BPA-B tuvo una disminución significativa de la expresión de la claudina-4, todas respecto al grupo control.

## **7.2 Efecto del BPA en los niveles paxilina en el útero de rata.**

Pasando a la Figura 16 donde tenemos los resultados de una de las proteínas que pertenece a las adhesiones focales que es paxilina. En la Figura 16A del DG 1, la banda del grupo BPA-B presentó una expresión más elevada que el control, mientras que el grupo tratado con la dosis alta la presentó disminuida en comparación al control.

Del DG 3, presentada en la Figura 16B, el cambio más notorio observado fue en el grupo tratado con la dosis alta, que presentó una mayor expresión que en el control, mientras que el de la dosis baja se observó ligeramente disminuida.

La Figura 16C corresponde al DG 6 en la cual se observó que la expresión de paxilina aumentó conforme aumentaba la concentración de BPA. En la última Figura 16D para el DG 7 observamos una disminución en la expresión de la proteína paxilina en ambos grupos tratados respecto al grupo control. El análisis densitométrico de las bandas reveló que no hay cambios significativos en ninguno de los tratamientos mostrados en los distintos días de gestación respecto a los grupos control en los niveles de paxilina. Eso sí, se pueden ver las pequeñas variaciones que se tienen en cada tratamiento.

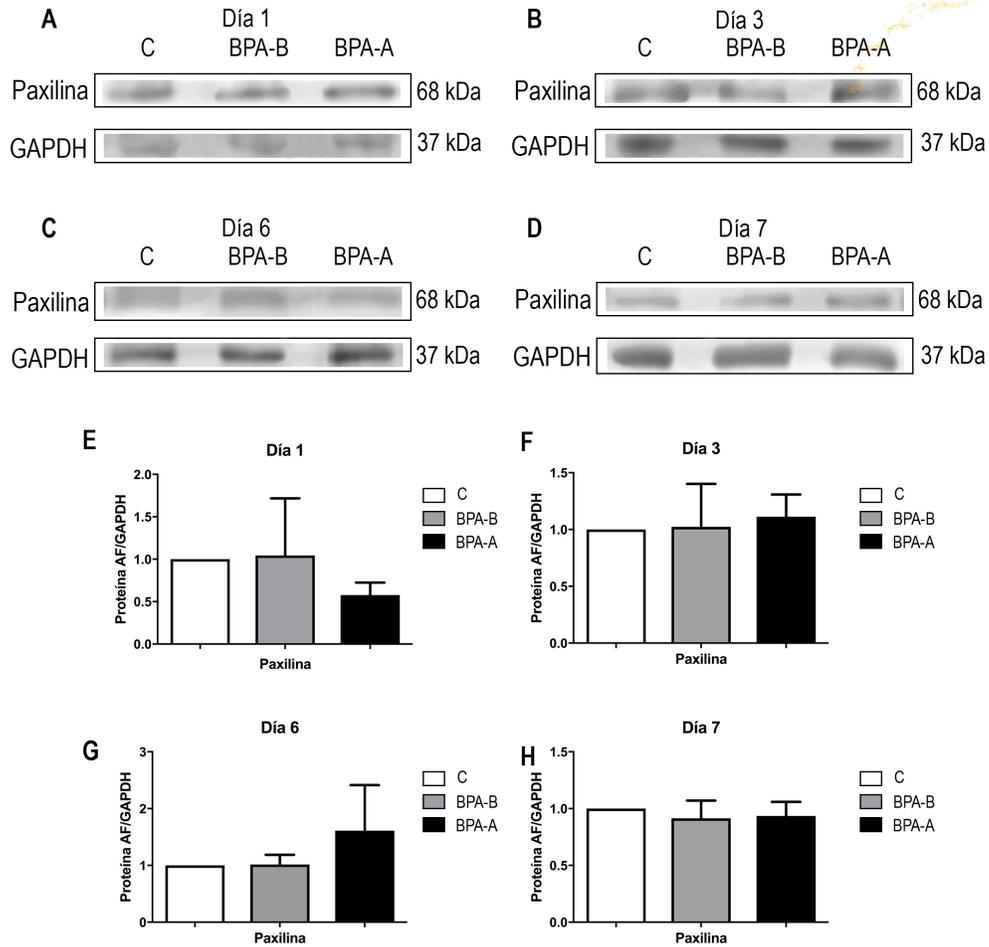


Fig 16. Expresión de la proteína de adhesiones focales paxilina durante los primeros días de la gestación, en el útero de ratas control (C) o tratadas perinatalmente con dosis baja (BPA-B) o alta (BPA\_A) de BPA. Resultados representativos de las inmunoréplicas por western-blot de cada una de las proteínas estudiadas (A, B, C y D) y sus gráficas (E, F, G y H). A y E, DG 1; B y F, DG 3; C y G, DG 6; D y H, DG 7.

## **8. Discusión**

La infertilidad y la pérdida en un embarazo temprano ha incrementado alrededor del mundo y afecta entre el 10-15 % de las parejas en diferentes países desarrollados (Hayashi, Saitou, & Yamanaka, 2012; Vite Vargas, Ortiz Núñez, Hernández, Tovar Rodríguez, & Ayala, 2005). Una causa de la reducción en la fertilidad es por una implantación fallida y se piensa que representa entre el 30-75 % de pérdidas preclínicas del embarazo en humanos (Schönfelder, et al., 2002). El incremento de la infertilidad se ha relacionado con la exposición a disruptores endócrinos, entre los cuales el BPA es uno de los más estudiados. En humanos el porcentaje de pacientes con concentraciones detectables de BPA es significativamente más alto en pacientes infértiles comparado con los pacientes fértiles (Caserta, et al., 2013).

En modelos animales, la exposición al BPA produce efectos adversos en los tejidos reproductivos de hembras y la exposición durante los periodos de implantación y placentación resulta en el decremento en el número de fetos y crías, y la tasa de supervivencia antes del destete (Honma, et al., 2002; Howdeshell, Hotchkiss, Thayer, Vandenberg, & vom Saal, 1999; Macklon, Geraedts, & Fauser, 2002; Markey, Coombs, Sonnenschein, & Soto, 2003; Rubin, Murray, Damassa, King, & Soto, 2001; Schönfelder, Friedrich, Paul, & Chahoud, 2004; Tachibana, et al., 2007).

Sin embargo, el mecanismo molecular de los efectos adversos del BPA se desconoce y para abordar este problema hemos estudiado si las proteínas de UE y AF de CEU constituyen un blanco del BPA cuando es administrado en el periodo perinatal.

Para tener una idea del mecanismo por medio del cual el BPA interrumpe la implantación, estudiamos el efecto de su administración perinatal en la expresión de proteínas UE y AF en CEU durante la gestación temprana.

Los resultados que obtuvimos de esta investigación fueron a través de inmunoréplica tipo western y los comparamos con los resultados obtenidos por otra metodología, la inmunohistoquímica que se realizó dentro del mismo laboratorio donde se llevó a cabo este proyecto.

Al comparar los resultados de la Figura 15A con la inmunohistoquímica (Figura 3), en el DG 1, vimos que ZO-1 en los dos tratamientos presentó una menor tinción en la inmunohistoquímica que con el control, Cl-1 aumentó su tinción en la dosis baja pero más en la dosis alta, Cl-3 por el contrario fue disminuyendo su tinción, Cl-4 se tiñó notablemente en la dosis baja del tratamiento y Cl-7 tuvo menos tinción en la dosis baja. Estos resultados de las inmunohistoquímicas concuerdan con los que obtuvimos en esta investigación, pues los niveles de tinción fueron similares con los niveles detectados de estas proteínas mediante anticuerpos en las inmunoréplicas.

Los resultados de la Figura 15B los comparamos con los resultados de la inmunohistoquímica (Fig. 4) que corresponden para el DG 3. En la inmunohistoquímica, ZO-1 presentó una menor tinción en la dosis baja, Cl-1 tienen muy poca variación en los dos tratamientos, Cl-3 estuvo más disminuido en la dosis baja y no tanto en su dosis alta, Cl-4 claramente se ve como aumentó esa tinción en los dos tratamientos y Cl-7 en la dosis baja se tiene disminuida la tinción mientras que en la dosis alta una mayor tinción. Los resultados de la inmunoréplica tipo western western-blot concuerdan con los de la inmunohistoquímica, presentándose un aumento significativo en la expresión de Cl-4 en el grupo BPA-B.

Los resultados del DG 6 (Figura 15C), se compararon con la Figura 5. Nos dimos cuenta de que coincidieron los distintos grados de expresión de las proteínas, detectados por western-blot, con la tinción que tuvieron en las inmunohistoquímicas: ZO-1 presentó un incremento en la inmunotinción en el grupo tratado con dosis baja y en el grupo tratado con la dosis alta, pudimos observar una menor tinción. Por otro lado, Cl-1 presentó un incremento en la inmunotinción en el grupo tratado con la dosis alta, Cl-3 no tuvo un gran cambio en la inmunotinción, Cl-4 en el grupo BPA-A fue notorio que la tinción es muy baja.

Al comparar la Figura 15D con la Figura 6, del DG 7, observamos que los cambios de tinción en la inmunohistoquímica coinciden con las tendencias observadas en los niveles de expresión de las diferentes proteínas detectadas por western-blot.

Como ZO-1, donde pudimos ver que se mantuvo semejante el nivel de inmunotinción en los tres grupos, CI-1 tuvo un incremento en la dosis alta, CI-3 presentó una disminución en la inmunotinción en los dos grupos de animales tratados con BPA.

En el grupo tratado con dosis baja, se observó que mientras CI-4 tuvo una menor tinción, para CI-7 se observó un incremento en la inmunotinción.

Comparando los resultados (Figura 16) de la expresión de la proteína paxilina que forma parte de las AF, observamos que en el DG 1 (Figura 16A) concordaron con la inmunohistoquímica (Figura 7), en la que en el grupo tratado con la dosis baja se apreció un aumento en la tinción apical.

De la Figura 16B, del DG 3, hubo una ligera disminución en la tinción basal en ambos grupos tratados con BPA, lo cual se ve en la tinción de la proteína de la Figura 8.

Comparamos los datos de la Figura 16C, del DG 6, con la Figura 9, y encontramos un incremento de la inmunotinción de paxilina en la membrana apical en la dosis baja y más en la dosis alta.

Comparando la Figura 16D, que corresponde al DG 7, con la Figura 10 en donde claramente se apreció como en la dosis baja y alta disminuyeron su expresión en las bandas e inmunotinción respectivamente.

Pero los cambios observados solo fueron significativos para CI-3, CI-4 y CI-7 del día 1 de gestación; CI-4 día 3 de gestación; CI-1 y CI-4 día 6 de gestación; CI-1, CI-3 y CI-4 día 7 de gestación. Mientras que paxilina no presentó alguna diferencia significativa entre tratamientos. Esto se podría deber a que paxilina se detectó en diferentes CEU, lo cual hace que a pesar de que veamos una disminución en una parte específica de la CEU por medio de inmunohistoquímica, en el método por western-blot cuantificamos la proteína que se encontraba en toda la CEU, lo cual explicaría que no tuviésemos diferencias significativas.

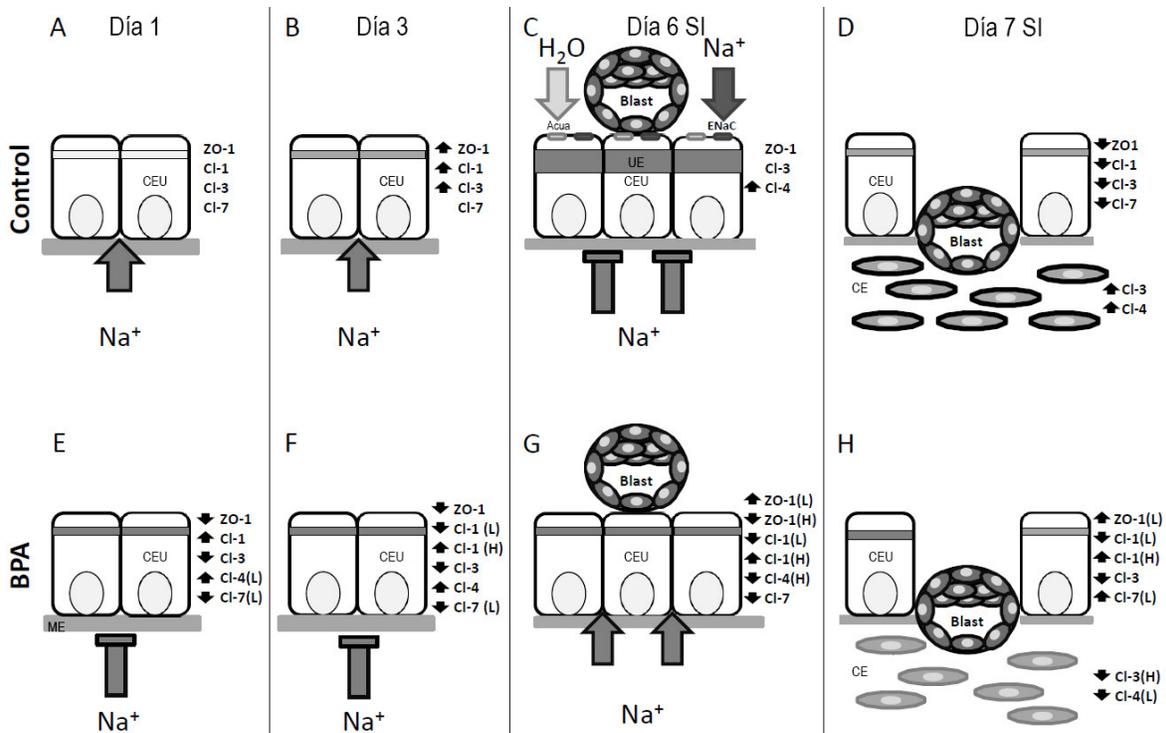


Fig. 17. Diagrama que representa la estructura de la UE en las CEU y células del estroma durante la gestación temprana. En la parte superior se muestran las UE de ratas control, mientras que en la parte de abajo es el tratamiento con BPA. Las proteínas presentes en las UE están nombradas al lado. Una zona más oscura de las UE indica más ramificaciones e interconexiones con hebras vecinas, mientras que una zona más clara indica hebras paralelas. El tamaño de las flechas del transporte paracelular indica el movimiento de fluidos e iones del estroma al lumen uterino. En los animales que fueron tratados con BPA las flechas al lado del nombre de la proteína indica un incremento (↑), disminución (↓), o no hay cambios (sin flecha) en la expresión de la proteína en comparación con el control en el DG respectivo. SI, sitio de implantación; Acua, acuaporina 5; Blast, blastocisto; Cl, claudina; ME, matriz extracelular; ENaC, canales epiteliales de Na<sup>+</sup>; CE, células estromales; UE, unión estrecha; CEU, células epiteliales uterinas.

Las UE están involucradas en la transformación de la membrana plasmática, esto hace que las CEU sean receptivas a las células trofoblásticas, y regulan el contenido y volumen del fluido luminal en el útero. Con base en los resultados obtenidos en este et al. trabajos de nuestro laboratorio hemos propuesto el modelo observado en la Figura 17. Durante el D1, se observa edema en el endometrio, que demanda un movimiento de fluido del estroma hacia el lumen uterino a través de la vía paracelular, el cual es garantizado por la presencia de UE laxas formadas por hebras paralelas localizadas en la parte apical de la membrana plasmática (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982).

En el DG1, ZO-1 estuvo más concentrada en la parte superior de la membrana lateral del grupo control, Cl-1 y Cl-3 se expresaron en un menor nivel, Cl-4 que funciona como una barrera de cationes (Van Itallie, Rahner, & Anderson, 2001) estuvo ausente y Cl-7 que está involucrada en la unión entre la célula y la matriz extracelular (Ding, et al., 2012), tuvo una alta expresión en la membrana basolateral (Fig. 17A).

Conforme pasan los días, la red de UE incrementa en profundidad. Se observó en el DG3 del grupo control, que ZO-1 se localizó en la parte superior de la membrana plasmática de las CEU y a lo largo de la membrana basolateral, por otra parte, la cantidad de Cl-1 y Cl-3 incrementó (Fig. 17B).

En el día de implantación, DG6, donde hay una unión irreversible del blastocisto al epitelio luminal, la red de UE se incrementa 3 veces en profundidad en la membrana plasmática lateral (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982; Murphy, 2000b) y también hay más ramificaciones e interconexiones con hebras vecinas (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982). Se observó en el grupo control que ZO-1 fue localizado en el tercio superior de la membrana plasmática lateral en el SI del DG6, Cl-1 en la mitad inferior, Cl-3 en la membrana lateral y Cl-7 en la mitad inferior. Se detectó Cl-4 en la membrana basolateral de las CEU (Fig. 17C). En humanos un incremento en la expresión del ARNm de Cl-4 se ha reportado en la ventana de implantación (Carson, et al., 2002; Kao, et al., 2002; Riesewijk, et al., 2003), y un incremento de la proteína Cl-4 se ha observado en el DG6 en ratas (Nicholson, Lindsay, & Murphy, 2010), sugiriendo un papel importante durante la implantación.

En células en cultivo, la sobreexpresión de Cl-4 incrementa la complejidad de las hebras de las TJ, por lo que el incremento en la expresión de Cl-4 en este día podría ser la responsable del aumento de las ramificaciones e interconexiones con hebras vecinas que se han observado por criofractura (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982). La Cl-4 disminuye la permeabilidad paracelular de  $\text{Na}^+$  (Van Itallie, Rahner, & Anderson, 2001), mientras que Cl-7 sirve como un canal paracelular de  $\text{Na}^+$  y una barrera para  $\text{Cl}^-$  (Alexandre, Lu, & Chen, 2005).

Se ha reportado que cuando se da la implantación, en el DG6, los canales transcelulares de  $\text{Na}^+$  del epitelio (ENaC) están sobre expresados en las CEU de ratas y son responsables de disminuir el contenido de  $\text{Na}^+$  en el fluido luminal (Salleh, Baines, Naftalin, & Milligan, 2005); Tsang, et al., 2001). Por lo que la presencia en el día de implantación de ENaC y Cl-4, y con la pérdida de Cl-7 de la región de UE, promueve el movimiento transcelular de  $\text{Na}^+$  de la parte apical a la superficie basal del epitelio sin una fuga a través de la vía paracelular. Este transporte de  $\text{Na}^+$ , acompañado de la reabsorción de agua del fluido luminal por acuaporinas 5 (Lindsay & Murphy, 2004; Lindsay & Murphy, 2006), permite la aposición del blastocisto al epitelio luminal, favoreciendo el contacto entre estas superficies (Fig. 17C) (Enders & Schlafke, 1967; Png & Murphy, 2000; Salleh, Baines, Naftalin, & Milligan, 2005). El pico de expresión de Cl-4 presente en el SI sugiere que la expresión de esta claudina es crucial en el proceso de implantación.

La expresión disminuida de Cl-7 en la mitad inferior de la membrana plasmática lateral de las CEU en el DG6, puede contribuir a la disminución de la adhesión entre la célula y la matriz extracelular, que genera la pérdida de la monocapa epitelial adherente durante el día de la implantación (Illingworth, et al., 2000; Kaneko, Lindsay, & Murphy, 2008; Preston, Lindsay, & Murphy, 2006). Se ha reportado que Cl-7 forma un complejo de proteína estable con Cl-1 e integrina  $\alpha_2$ , sugiriendo así que el mecanismo por el que Cl-7 promueve la adhesión célula-matriz es estabilizando a la integrina  $\alpha_2$ , que es responsables de la unión a los componentes de la matriz extracelular (Ding, et al., 2012).

En el DG7, el blastocisto penetra a través de las CEU hacia el estroma, y se expresan las Cl-3 y Cl-4 en células estromales (Fig. 17D). Esta observación está relacionada con otras, mostrando la presencia de ZO-1, Cl-1 y ocludina en células estromales en el útero de ratón (Paria, Zhao, Das, Dey, & Yoshinaga, 1999; Wang, Matsumoto, Zhao, Das, & Paria, 2004) y reafirma la idea de la formación de una barrera en las células estromales que pudiera proteger al blastocisto de las inmunoglobulinas maternas.

Los cambios más importantes en los animales tratados con BPA fue la presencia de Cl-4 desde el DG1 en el grupo BPA-B y desde el DG3 en el grupo BPA-A (Fig. 17E y F), mientras que en grupo control Cl-4 solo se expresa en altos niveles en el DG6.

La aparición prematura de Cl-4 puede disminuir en las CEU, la permeabilidad paracelular de Na<sup>+</sup> y en consecuencia podría cambiar la composición del fluido luminal que en su momento puede obstaculizar el proceso de implantación.

El BPA también indujo el cambio en la localización de ZO-1 durante el DG3. Así, en el control, la expresión de ZO-1 en las CEU fue alta a lo largo de la membrana basolateral, mientras que, en los grupos tratados con BPA, la expresión de ZO-1 estuvo disminuida y restringida en la parte superior de la membrana lateral (Fig. 17F). Como ZO-1 funciona como una plataforma para la polimerización de las claudinas (Umeda, y otros, 2006), este resultado sugiere que el tratamiento con BPA puede impedir el incremento en profundidad que las UE tienen en el DG3 (Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1981; Murphy, Swift, Mukherjee, & Rogers, 1982).

La proteína Cl-7 fue localizada en la membrana basolateral de CEU durante el DG1 y 3 en el grupo control y BPA-A. En el grupo BPA-B, durante el DG1 y 3, la expresión de Cl-7 disminuye en CEU, y la proteína se concentró en la mitad inferior de la membrana plasmática lateral. Este cambio, junto con el incremento en la expresión de Cl-4, apoyan la idea que los tratamientos con BPA-B favorecen el establecimiento de una unión hermética impermeable a los cationes en el DG1 (Fig. 8E). Así mismo, como Cl-7 promueve la adhesión célula-matriz extracelular (Ding, et al., 2012), la disminución en la expresión de esta proteína puede sugerir una alteración en el mantenimiento de una barrera epitelial uterina intacta durante la fase no receptiva.

En las células estromales, durante el DG 7, el tratamiento con BPA-B indujo la disminución de la Cl-4 en el SI (Fig. 17H). Por otro lado, el tratamiento de BPA-A indujo la disminución de Cl-3 en el SI (Fig. 17H). La baja expresión en estas claudinas en el SI puede impedir la formación de la barrera entre las células estromales que bloquean el acceso de las inmunoglobulinas maternas al embrión.

También se evaluó el efecto del BPA sobre la expresión de paxilina que forma parte de las proteínas de las AF, pudiendo formar parte del proceso de implantación en ratas. Se ha observado que paxilina tuvo cambios en la región basal en CEU en la gestación temprana.

Las AF están localizadas entre la célula y matriz extracelular, teniendo una importante función en la adhesión celular (Turner, Schaller, & Parsons, 1993; Turner, 2000; Schaller, 2001; Brown & Turner, 2004). Existen estudios en los que se vio en CEU del DG1 un engrosamiento en la membrana plasmática basal y en la lámina basal, donde se presentaron moléculas electrodensas que se identificaron como AF, pero cuando llega el día de la implantación, la membrana basal se hace más plegada y sinuosa, mientras que la lámina basal se hace más gruesa y las AF se pierden (Shion & Murphy, 1995; Murphy, 2000a).

El desamblaje de la AF es un proceso importante en la implantación, permitiendo disminuir la adhesión de las CEU a la lámina basal, facilitando su separación en el sitio de implantación, así el blastocisto puede penetrar el epitelio hacia las células deciduales (Kaneko, Lindsay, & Murphy, 2008; Kaneko, Lecce, & Murphy, 2009; Kaneko, Lecce, Day, & Murphy, 2011).

En el inicio de la gestación, las AF se localizan en la membrana basal de las CEU para mantener una barrera epitelial. Las AF en el DG6 se pierden de la membrana basal de las CEU, esto permite tener menos adherencia a la lámina basal y así se pueden desprender, con lo que el blastocisto puede penetrar e invadir hacia las células deciduales. En este día, las AF se localiza en la membrana apical de las CEU, al igual que en las células trofoblásticas. La ubicación en esta zona podría ayudar a establecer la interacción entre el blastocisto y las CEU para adherirse durante la implantación (Figura 9 y Tabla 2). En el grupo control del DG6 hubo una disminución de paxilina en la membrana basal y aumentó en la membrana apical.

En el día posterior al apareamiento DG1, los dos tratamientos con BPA provocaron un incremento de la expresión de paxilina. Para el DG6 también incrementó la expresión de paxilina en la membrana basal para los dos tratamientos con BPA, en consecuencia, podría provocar que las CEU sean más adherentes a la ME y así evitar que el blastocisto pueda penetrar.

Ya en el DG7 penetra el blastocisto al estroma, y hay una menor expresión de paxilina en la membrana apical en el grupo BPA-A, que podría afectar la interacción que hay entre las CEU y el blastocisto. Entonces, estas observaciones señalan que la administración perinatal de BPA provoca cambios en la expresión y ubicación de paxilina en las CEU, que podría afectar la implantación del blastocisto.

## **9. Conclusión**

Existen cambios en los niveles de expresión de las proteínas que pertenecen a las uniones estrechas y adhesiones focales en las células del epitelio uterino, causados por la exposición perinatal de BPA, que podría explicar una baja receptividad del útero a la implantación del blastocisto, cuando los animales alcanzan la adultez y están gestantes.

## 10. Referencias

- Aghajanova, L., & Giudice, L. (2011). Effect of bisphenol A on human endometrial stromal fibroblasts in vitro. *Reprod Biomed Online*, 249-256.
- Alexandre, M., Lu, Q., & Chen, Y. (2005). Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci*, 2683-2693.
- Balakrishnan, B., Henare, K., Thorstensen, E., Ponnampalam, A., & Mitchell, M. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 393.e1-7.
- Berger, R., Hancock, T., & deCatanzaro, D. (2007). Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reprod Toxicol*, 138-144.
- Berger, R., Shaw, J., & deCatanzaro, D. (2008). Impact of acute bisphenol-A exposure upon intrauterine implantation of fertilized ova and urinary levels of progesterone and 17beta-estradiol. *Reprod Toxicol*, 94-99.
- Bio-Rad. (s.f.). Instruction Manual, Mini-PROTEAN ® Tetra Cell - Bio-Rad. Obtenido de [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf): <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>
- Bio-Rad. (s.f.). Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell. Obtenido de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>
- Bredhult, C., Sahlin, L., & Olovsson, M. (2009). Gene expression analysis of human endometrial endothelial cells exposed to Bisphenol A. *Reprod Toxicol*, 18-25.
- Briño-Enríquez, M., Robles, P., Camats-Tarruella, N., García-Cruz, R., Roig, I., Cabero, L., . . . Caldés, M. (2011). Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development. *Hum Reprod*, 2807-2818.

- Brown, M., & Turner, C. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev*, 1315-1339.
- Burridge, E. (2003). Bisphenol A: Product profile. *Eur Chem News*, 14-20.
- Cantonwine, D., Ferguson, K., Mukherjee, B., McElrath, T., & Meeker, J. (2015). Urinary Bisphenol A Levels during Pregnancy and Risk of Preterm Birth. *Environ Health Perspect*, 895-901.
- Carson, D., Lagow, E., Thathiah, A., Al-Shami, R., Farach-Carson, M., Vernon, M., . . . Lessey, B. (2002). Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod*, 871-879.
- Caserta, D., Ciardo, F., Bordi, G., Guerranti, C., Fanello, E., Perra, G., . . . Moscarini, M. (2013). Correlation of endocrine disrupting chemicals serum levels and white blood cells gene expression of nuclear receptors in a population of infertile women. *Int J Endocrinol*, 510703.
- Claude, P., & Goodenough, D. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol*, 390-400.
- Crain, D., Janssen, S., Edwards, T., Heindel, J., Ho, S., Hunt, P., . . . Guillette, L. J. (2008). Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril*, 911-940.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J., Giudice, L., Hauser, R., Prins, G., Soto, A., . . . AC, G. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*, 293-342.
- Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., . . . Chen, Y. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology*, 305-315.

- Ding, L., Lu, Z., Foreman, O., Tatum, R., Lu, Q., Renegar, R., . . . Chen, Y. (2012). Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology*, 305-315.
- Ehrlich, S., Williams, P., Missmer, S., Flaws, J., Berry, K., Calafat, A., . . . Hauser, R. (2012b). Urinary bisphenol A concentrations and implantation failure among women undergoing in vitro fertilization. *Environ Health Perspect*, 978-983.
- Ehrlich, S., Williams, P., Missmer, S., Flaws, J., Ye, X., Calafat, A., . . . Hauser, R. (2012a). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 3583-3592.
- Enders, A., & Schlafke, S. (1967). A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat*, 185-225.
- Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., & Libertun, C. (2010). Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ Health Perspect*, 1217-1222.
- Fritz, M., & Speroff, L. (2011). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fujimoto, V., Kim, D., vom Saal, F., Lamb, J., Taylor, J., & Bloom, M. (2011). Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1816-1819.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol*, 1617-1626.
- Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E., & Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res*, 251-264.

- Hardin, B., Bond, G., Sikov, M., Andrew, F., Beliles, R., & Niemeier, R. (1981). Testing of selected workplace chemicals for teratogenic potential. *Scand J Work Environ Health*, 66-75.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E., Hibbard, J., & Stevenson, B. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 199-208.
- Hayashi, Y., Saitou, M., & Yamanaka, S. (2012). Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. *Fertil Steril*, 1250-1259.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D., Katsu, Y., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol*, 117-122.
- Howdeshell, K., Hotchkiss, A., Thayer, K., Vandenberg, J., & vom Saal, F. (1999). Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*, 763-764.
- Hunt, P., Koehler, K., Susiarjo, M., Hodges, C., Ilagan, A., Voigt, R., . . . Hassold, T. (2003). Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*, 546-553.
- Illingworth, I., Kiszka, I., Bagley, S., Ireland, G., Garrod, D., & Kimber, S. (2000). Desmosomes are reduced in the mouse uterine luminal epithelium during the preimplantation period of pregnancy: a mechanism for facilitation of implantation. *Biol Reprod*, 1764-1773.
- Kaneko, Y., Lecce, L., & Murphy, C. (2009). Ovarian hormones regulate expression of the focal adhesion proteins, talin and paxillin, in rat uterine luminal but not glandular epithelial cells. *Histochem Cell Biol*, 613-622.
- Kaneko, Y., Lecce, L., Day, M., & Murphy, C. (2011).  $\beta(1)$  and  $\beta(3)$  integrins disassemble from basal focal adhesions and  $\beta(3)$  integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation. *Reprod Fertil Dev*, 481-495.

- Kaneko, Y., Lindsay, L., & Murphy, C. (2008). Focal adhesions disassemble during early pregnancy in rat uterine epithelial cells. *Reprod Fertil Dev*, 892-899.
- Kaneko, Y., Murphy, C., & Day, M. (2014). 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*, 423-430.
- Kao, L., Tulac, S., Lobo, S., Imani, B., Yang, J., Germeyer, A., . . . Giudice, L. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 2119-38.
- Karwacka, A., Zamkowska, D., Radwan, M., & Jurewicz, J. (2017). Exposure to modern, widespread environmental endocrine disrupting chemicals and their effect on the reproductive potential of women: an overview of current epidemiological evidence. *Hum Fertil (Camb)*, 1-24.
- Kim, H., Han, S., Yoo, S., Lee, B., & Park, K. (2001). Potential estrogenic effects of bisphenol-A estimated by in vitro and in vivo combination assays. *J Toxicol Sci*, 111-118.
- Kim, J., Shin, H., Cha, S., Koh, W., Chung, M., & Han, S. (2001). Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Sci*, 2611-2625.
- Kundakovic, M., & Champagne, F. (2011). Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behav Immun*, 1084-1093.
- Kundakovic, M., Gudsruk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R., Perera, F., & Champagne, F. (2013). Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 9956-9961.
- La Rocca, C., Tait, S., Guerranti, C., Busani, L., Ciardo, F., Bergamasco, B., . . . Mantovani, A. (2014). Exposure to endocrine disruptors and nuclear receptor gene expression in infertile and fertile women from different Italian areas. *Int J Environ Res Public Health*, 10146-10164.

- Li, Q., Davila, J., Bagchi, M., & Bagchi, I. (2016). Chronic exposure to bisphenol a impairs progesterone receptor-mediated signaling in the uterus during early pregnancy. *Receptors Clin Investig*, e1369.
- Lindsay, L., & Murphy, C. (2004). Redistribution of aquaporins in uterine epithelial cells at the time of implantation in the rat. *Acta Histochem*, 299-307.
- Lindsay, L., & Murphy, C. (2006). Redistribution of aquaporins 1 and 5 in the rat uterus is dependent on progesterone: a study with light and electron microscopy. *Reproduction*, 369-378.
- Macklon, N., Geraedts, J., & Fauser, B. (2002). Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update*, 333-343.
- Markey, C., Coombs, M., Sonnenschein, C., & Soto, A. (2003). Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev*, 67-75.
- Martínez-Peña, A., Rivera-Baños, J., Méndez-Carrillo, L., Ramírez-Solano, M., Galindo-Bustamante, A., Páez-Franco, J., . . . Mendoza-Rodríguez, C. (2017). Perinatal administration of bisphenol A alters the expression of tight junction proteins in the uterus and reduces the implantation rate. *Reprod Toxicol*, 106-120.
- Melnick, R., Lucier, G., Wolfe, M., Hall, R., Stancel, G., Prins, G., . . . Kohn, M. (2002). Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect.*, 427-431.
- Méndez Carrillo, L. (2016). Efecto de la administración perinatal del disruptor endócrino Bisfenol-A sobre la expresión de las proteínas de adhesión focal: Talina y Paxilina, en el útero de ratas durante la gestación temprana (tesis de licenciatura). Ciudad de México, México: UNAM.

- Mendola, P., Messer, L., & Rappazzo, K. (2008). Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil Steril*, 81-94.
- Mendoza-Rodríguez, C., García-Guzmán, M., Baranda-Avila, N., Morimoto, S., Perrot-Appianat, M., & Cerbón, M. (2011). Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reprod Toxicol*, 177-183.
- Mendoza-Rodríguez, C., González-Mariscal, L., & Cerbón, M. (2005). Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Cell Tissue Res*, 315-330.
- Miao, M., Yuan, W., Zhu, G., He, X., & Li, D. (2011). In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reprod Toxicol*, 64-68.
- Mueller, B., & Bale, T. (2008). Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci*, 9055-9065.
- Muñoz-de-Toro, M., Markey, C., Wadia, P., Luque, E., Rubin, B., Sonnenschein, C., & Soto, A. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*, 4138-4147.
- Murphy, C. (2000a). Junctional barrier complexes undergo major alterations during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells. *Hum Reprod*, 182-188.
- Murphy, C. (2000b). The plasma membrane transformation of uterine epithelial cells during pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*, 23-28.
- Murphy, C., Rogers, P., Hosie, M., Leeton, J., & Beaton, L. (1992). Tight junctions of human uterine epithelial cells change during the menstrual cycle: a morphometric study. *Acta Anat (Basel)*, 36-38.

- Murphy, C., Swift, J., Mukherjee, T., & Rogers, A. (1981). Effects of ovarian hormones on cell membranes in the rat uterus. II. Freeze-fracture studies on tight junctions of the lateral plasma membrane of the luminal epithelium. *Cell Biophys*, 57-69.
- Murphy, C., Swift, J., Mukherjee, T., & Rogers, A. (1982). The structure of tight junctions between uterine luminal epithelial cells at different stages of pregnancy in the rat. *Cell Tissue Res*, 281-286.
- Murphy, C., Swift, J., Need, J., Mukherjee, T., & Rogers, A. (1982). A freeze-fracture electron microscopic study of tight junctions of epithelial cells in the human uterus. *Anat Embryol (Berl)*, 367-370.
- Newbold, R., Jefferson, W., & Padilla-Banks, E. (2009). Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect*, 879-885.
- Nicholson, M., Lindsay, L., & Murphy, C. (2010). Ovarian hormones control the changing expression of claudins and occludin in rat uterine epithelial cells during early pregnancy. *Acta Histochem*, 42-52.
- Novikova, S., He, F., Bai, J., Cutrufello, N., Lidow, M., & Undieh, A. (2008). Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring. *PLoS One*, e1919.
- Orchard, M., & Murphy, C. (2002). Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. *Acta Histochem*, 149-155.
- Paria, B., Zhao, X., Das, S., Dey, S., & Yoshinaga, K. (1999). Zonula occludens-1 and E-cadherin are coordinately expressed in the mouse uterus with the initiation of implantation and decidualization. *Dev Biol*, 488-501.
- Pinney, S., Mesaros, C., Snyder, N., Busch, C., Xiao, R., Aijaz, S., . . . Manson, J. (2017). Second trimester amniotic fluid bisphenol A concentration is associated with decreased birth weight in term infants. *Reprod Toxicol*, 1-9.

- Png, F., & Murphy, C. (2000). Closure of the uterine lumen and the plasma membrane transformation do not require blastocyst implantation. *Eur J Morphol*, 122-127.
- Preston, A., Lindsay, L., & Murphy, C. (2006). Desmosomes in uterine epithelial cells decrease at the time of implantation: an ultrastructural and morphometric study. *J Morphol*, 103-108.
- Richter, C., Birnbaum, L., Farabollini, F., Newbold, R., Rubin, B., Talsness, C., . . . vom Saal, F. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, 199-224.
- Riesewijk, A., Martín, J., van Os, R., Horcajadas, J., Polman, J., Pellicer, A., . . . Simón, C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*, 253-264.
- Riesewijk, A., Martín, J., van Os, R., Horcajadas, J., Polman, J., Pellicer, A., . . . Simón, C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*, 253-264.
- Rubin, B., Murray, M., Damassa, D., King, J., & Soto, A. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*, 675-680.
- Salleh, N., Baines, D., Naftalin, R., & Milligan, S. (2005). The hormonal control of uterine luminal fluid secretion and absorption. *J Membr Biol*, 17-28.
- Salleh, N., Baines, D., Naftalin, R., & Milligan, S. (2005). The hormonal control of uterine luminal fluid secretion and absorption. *J Membr Biol*, 17-28.
- Santamaría, C., Durando, M., Muñoz de Toro, M., Luque, E., & Rodriguez, H. (2016). Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 220-230.
- Schaller, M. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 6459-6472.

- Schlafke, S., & Enders, A. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod*, 41-65.
- Schönfelder, G., Flick, B., Mayr, E., Talsness, C., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia*, 98-102.
- Schönfelder, G., Friedrich, K., Paul, M., & Chahoud, I. (2004). Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia*, 584-594.
- Schumann, S., Buck, V., Classen-Linke, I., Wennemuth, G., & Grümmer, R. (2015). Claudin-3, claudin-7, and claudin-10 show different distribution patterns during decidualization and trophoblast invasion in mouse and human. *Histochem Cell Biol*, 571-585.
- Sharpe, R., & Skakkebaek, N. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 1392-1395.
- Shion, Y., & Murphy, C. (1995). The basal plasma membrane and lamina densa of uterine epithelial cells are both altered during early pregnancy and by ovarian hormones in the rat. *Eur J Morphol*, 257-264.
- Signorile, P., Spugnini, E., Mita, L., Mellone, P., D'Avino, A., Bianco, M., . . . Baldi, A. (2010). Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen Comp Endocrinol*, 318-325.
- Skakkebaek, N., Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Carlsen, E., Petersen, P., Giwercman, A., . . . Müller, J. (1998). Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS*, 3-11.
- Skinner, M., Anway, M., Savenkova, M., Gore, A., & Crews, D. (2008). Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior. *PLoS One*, e3745.

- Snijder, C., Heederik, D., Pierik, F., Hofman, A., Jaddoe, V., Koch, H., . . . Burdorf, A. (2013). Fetal growth and prenatal exposure to bisphenol A: the generation R study. *Environ Health Perspect*, 393-398.
- Tachibana, T., Wakimoto, Y., Nakamuta, N., Phichitraslip, T., Wakitani, S., Kusakabe, K., . . . Kiso, Y. (2007). Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. *J Reprod Dev*, 509-514.
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Takai, Y., & Taketani, Y. (2004). Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J*, 165-169.
- Tomza-Marciniak, A., Stępkowska, P., Kuba, J., & Pilarczyk, B. (2017). Effect of bisphenol A on reproductive processes: A review of in vitro, in vivo and epidemiological studies. *J Appl Toxicol*, 51-80.
- Tsang, L., Chan, L., Wang, X., So, S., Yuen, J., Fiscus, R., & Chan, H. (2001). Enhanced epithelial Na(+) channel (ENaC) activity in mouse endometrial epithelium by upregulation of gammaENaC subunit. *Jpn J Physiol*, 539-543.
- Turner, C. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*, 231-236.
- Turner, C., Schaller, M., & Parsons, J. (1993). Tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase pp125FAK during development: relation to paxillin. *J Cell Sci*, 637-645.
- Uchida, K., Suzuki, A., Kobayashi, Y., Buchanan, D., Sato, T., Watanabe, H., . . . Iguchi, T. (2002). Bisphenol-A Administration during Pregnancy Results in Fetal Exposure in Mice and Monkeys. *J Health Sci*, 579-582.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., . . . Furuse, M. T. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, 741-754.

- Van Itallie, C., Rahner, C., & Anderson, J. (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 1319-1327.
- Vandenberg, L., Chahoud, I., Heindel, J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 1055-1070.
- Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 139-177.
- Varayoud, J., Ramos, J., Bosquiazzo, V., Lower, M., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. (2011). Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology*, 1101-1111.
- Vite Vargas, J., Ortiz Núñez, D., Hernández, M. I., Tovar Rodríguez, J., & Ayala, A. (2005). Análisis epidemiológico de la infertilidad en una población mexicana. *Ginecol Obstet Mex*, 360-364.
- Vom Saal, F., Akingbemi, B., Belcher, S., Birnbaum, L., Crain, D., Eriksen, M., . . . Zoeller, R. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*, 131-138.
- Wadia, P., Cabaton, N., Borrero, M., Rubin, B., Sonnenschein, C., Shioda, T., & Soto, A. (2013). Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PLoS One*, e63902.
- Wang, X., Matsumoto, H., Zhao, X., Das, S., & Paria, B. (2004). Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Sci*, 53-62.
- Wang, Z., Lu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Liu, T., & Qu, X. (2015). Effect of Bisphenol A on invasion ability of human trophoblastic cell line BeWo. *Int J Clin Exp Pathol*, 14355-14364.

Welshons, W., Nagel, S., & vom Saal, F. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 56-59.

Xiao, S., Diao, H., Smith, M., Song, X., & Ye, X. (2011). Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice. *Reprod Toxicol*, 434-441.

Ziv-Gal, A., Wang, W., Zhou, C., & Flaws, J. (2015). The effects of in utero bisphenol A exposure on reproductive capacity in several generations of mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 354-362.

## **11. Anexo A. Amortiguadores**

### **Amortiguador de corrida 10X**

Para 1L disolver en 500 mL de agua desionizada y aforar.

Tris-base 250 mM	30.3 g
Glicina 1.92 M	144 g
SDS 1% m/v	10.0 g

### **Gel separador**

	15%	8%
Acrilamida (-4°C)	7.5 mL	4 mL
Tris pH= 8.8 (-4°C)	3.8 mL	3.8 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	3.5 mL	6.9 mL
SDS 10%	0.150 mL	0.15 mL
PSA 10% (-20°C)	0.150 mL	0.15 mL
TEMED (T.A)	0.006 mL	0.009 mL

### **Gel concentrador**

	8%
Acrilamida (-4°C)	0.83 mL
Tris pH= 8.8 (-4°C)	0.63 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	3.4 mL
SDS 10%	0.05 mL
PSA 10% (-20°C)	0.05 mL
TEMED (T.A)	0.005 mL

**Amortiguador de corrida 10X 1L → Amortiguador de corrida 1X 1L**

$$V_{\text{Buffer de corrida 10X}} = \frac{(1X)(1L)}{(10X)}$$

= 0.1 L o 100 ml Aforar a 1L con agua desionizada.

### **Amortiguador de transferencia**

Amortiguador de corrida 10X	100 mL
Agua desionizada	700 mL
Metanol	200 mL

### **Solución salina amortiguadora con Tris 1% (TBS)**

NaCl	8 g	Disolver en 500 mL y aforar a 1L con agua destilada.
KCl	0.2 g	
Tris-base	2.3 g	Ajustar el pH a 7.6.

### **TBS-Tween**

Tween 20	1 mL
TBS 1%	1000 mL

### **Amortiguador de carga X2**

4% Dodecil sulfato de sodio (SDS)
10% β-mercaptoetanol
20% glicerol
0.004% azul de bromofenol
0.125 M Tris-HCl pH: 6.8

### **Persulfato de amonio 10% (PSA)**

0.1g Persulfato de amonio
1 mL agua desionizada

### **SDS 10%**

10 g SDS
100 mL agua desionizada

**1.5 M Tris-HCl pH: 8.8**

27.23 g Tris-base

80 mL agua desionizada

Ajustar el pH: 8.8 con HCl llevar a 150 mL con agua destilada y guardar a 4°C.

**0.5 M Tris-HCl pH: 6.8**

6 g Tris-base

60 mL agua desionizada.

Ajustar el pH: 6.8 con HCl y llevar a 100 mL.

**Amortiguador de lisis (RIPA)  
para 5 mL**

2.4 mL Amortiguador fosfato salino (PBS) 1%

50 µL NP 40 1% (v/v)

0.025 g Deoxicolato de sodio 0.5%

50 µL (tomado de una solución de SDS al 10%) SDS 0.1%

2.5 mL de Inhibidor de proteínas 1%(1 tableta en 5 mL de agua destilada)

## 12. Anexo B. Soluciones para inmunoréplicas tipo Western.

Immobilon™ Western HRP Substrate Luminol Reagent:

Kit Cat. No. WBKLS0500

Merck Miliipore

### Anticuerpos

**Paxilina** (H-114) sc-5574  
Lot#G0S12

Rabbit Polyclonal IgG

Santa Cruz Biotechnology

**GAPDH** (FL-335) sc-25778  
Lot#D1014

Rabbit Polyclonal IgG

Santa Cruz Biotechnology

**CI-3** Ref.341700 Lot#1529314A

Rabbit anti-Claudin 3

Invitrogen

**CI-7** 34-9100 Lot#41191501

Rabbit anti-Claudin 7

ZYMED

**Goat anti-mouse IgG-HRP**

sc-2005 Lot#H0415

Santa Cruz Biotechnology

**Talina** (H-300) sc-15336  
Lot#D0811

Rabbit Polyclonal IgG

Santa Cruz Biotechnology

**CI-1** Ref.519000 Lot#1224702A

Rabbit anti-Claudin 1

Invitrogen

**CI-4** Ref.329400 Lot#1449529A

Mouse anti-Claudin 4

Invitrogen

**ZO-1** 61-7300 Lot#41191369

Rabbit anti-ZO1

ZYME

**Goat anti-rabbit IgG-HRP**

sc-2004 Lot#H11115

Santa Cruz Biotechnology