



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y el Control Motor.

Tesis para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Fisiológicas

Efectos del Bisfenol A sobre la conducta materna y el neurodesarrollo temprano en las ratas de alto y bajo bostezo.

Presenta: Norman Lima Serrano

Directores de Tesis: Dr. José Ramón Eguibar Cuenca
Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez.

Mayo 2024



Agradecimientos.

Al Dr. José Ramón Eguibar Cuenca y a la Dra. Ma. del Carmen Cortés Sánchez por el tiempo y apoyo otorgados para la realización de este trabajo de tesis.

A la M. en C. Araceli Ugarte por la ayuda y apoyo otorgados.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca con numero 1173475 otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Fisiológicas, PNPC-CONAHCYT.

A los proyectos de investigación financiado por PRONACES-CONACYT No. 194171, por VIEP-BUAP 2021-2022 al Cuerpo Académico en Neuroendocrinología 2023 (BUAP-CA-288).

A el Dr. Jorge Morales Montor del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La Dra. Ana Karen Nava del Instituto de Ciencias de la Atmosfera de Cambio Climático de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Resumen.

El Bisfenol A (BPA), un xenoestrógeno sintético con acción endocrino-disruptiva es uno de los mayores contaminantes proveniente de productos plásticos desechables debido a su capacidad de transferencia a los alimentos y al aire por medio de aerosoles y el contacto; se ha reportado que existe una exposición de 25 ng/kg/día, hasta una concentración de 50 µg/kg/día. La exposición continua con el BPA se ha relacionado con una mayor prevalencia de alteraciones corporales y enfermedades tales como, cambios en la distancia anogenital en humanos y animales experimentales; la aparición de desórdenes mentales y reproductivos, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y respiratorias, así como cáncer. Se ha destacado que la exposición al BPA en etapas tempranas del desarrollo, como los periodos de gestación y lactancia aumentan el riesgo de alteraciones y enfermedades a corto y largo plazo por modificaciones neuroendocrinas que alteran la conducta materna en humanos y modelos animales, así como el subsecuente desarrollo de las crías.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la administración de BPA en las ratas de alto y bajo bostezo, un modelo animal que difiere en su capacidad de respuesta al estrés. Se emplearon ratas hembra gestantes de 3 meses de edad; recibieron 3 meses de edad a las que se les administró 250 µg/Kg/día de BPA diluido en una concentración 0.05% de alcohol etílico en agua purificada durante 42 ± 2 días, se evaluó la conducta materna durante los días 1, 3, 5, 7 y 9 DPN, enfocándose en los tiempos de amamantamiento de alta y baja intensidad, los tiempo de lamido corporal y genital, además de los tiempos de acarreamiento, durante el día 7 DPN se realizaron pruebas para evaluar el neurodesarrollo a las crías, dichas pruebas fueron la prueba de enderezamiento, la prueba de evitación de bordes y la prueba de geotaxia negativa.

Se observaron cambios en los tiempos de las ratas tratadas con BPA en comparación a las ratas control en las pruebas de neurodesarrollo, principalmente en las pruebas de geotaxia negativa donde hubo un aumento significativo en las hembras de bajo bostezo y en los machos de alto bostezo, en la prueba de enderezamiento se observó un aumento significativo en las ratas de bajo bostezo, aunque, es importante notar que en general tienen menores tiempos de respuesta las ratas de alto bostezo en comparación a las de bajo bostezo. Para los tiempos de amamantamiento de alta y baja intensidad no se observaron cambios significativos, por último, se observó una diferencia significativa en el tiempo de lamido corporal tardío de las ratas de alto bostezo en comparación al control. Las ratas de bajo bostezo mostraron un mejor despliegue de la conducta materna además de ser las más afectadas por el BPA, por alteración del sistema dopaminérgico, del núcleo accumbens y el área preóptica media; las crías mostraron alteraciones en la prueba de enderezamiento y de geotaxia negativa por alteraciones vestibulares y/o musculoesqueléticas.

Índice.

- I. Introducción.
- II. El Bisfenol A.
- III. Conducta materna.
 - i. Conducta materna en roedores.
 - ii. Áreas cerebrales involucradas en la conducta materna.
 - iii. Neurotransmisores involucrados en la regulación de la conducta materna.
 - iv. Hormonas involucradas en la conducta materna.
- IV. Bisfenol A y sus alteraciones.
 - i. Endocrinas.
 - ii. Neuronales.
- V. Modelos animales para el estudio de la conducta materna y el neurodesarrollo temprano.
 - i. Las ratas de bajo y alto bostezo.
 - ii. Evaluación del neurodesarrollo motor en las crías de rata.
 - iii. Los reflejos motores.
- VI. Justificación.
- VII. Hipótesis.
- VIII. Objetivos.
 - i. General.
 - ii. Particulares.
- IX. Materiales y métodos.
 - i. Sujetos experimentales.
 - ii. Administración farmacológica.
 - iii. Evaluación de la conducta materna.
 - iv. Evaluación del neurodesarrollo de las crías.
 - v. Análisis estadístico.
- X. Resultados.
- XI. Discusión.
- XII. Conclusiones.
- XIII. Referencias.

I. Introducción.

El Bisfenol A (BPA) se ha estudiado desde 1936, es uno de los químicos de mayor uso a nivel mundial, con una producción de 7.7 millones de toneladas métricas en el año 2015. Las primeras preocupaciones del uso del BPA se deben a su capacidad endocrina disruptiva y a sus débiles propiedades estrogénicas, a partir del estudio en ratas hembra donde indujo la cornificación del epitelio vaginal (Shoei-Lung y cols., 2012; Sonavane y cols., 2019; Vendenberg y cols., 2020).

El BPA es un xenoestrógeno sintético usado en la producción de contenedores plásticos de policarbonato, como las botellas para bebés, tubos de uso médico, juguetes, las resinas epóxicas que recubren latas de comidas y bebidas; además de ser utilizados para ablandar y aumentar la flexibilidad de los productos plásticos de cloruro de polivinilo (PVC, de sus siglas del inglés); (Shoei-Lung y cols., 2012; Sarria y cols., 2019).

A nivel ambiental se ha reportado con la encuesta geológica de los Estados Unidos de América concentraciones de BPA en vertederos de 6.4 mg/L; además Japón reportó que el BPA es el responsable del 84% de la actividad estrogénica en vertederos (Vendenberg y cols., 2020).

Adicionalmente, se ha descrito que tiene la capacidad de filtrarse hacia los productos alimenticios durante la manufactura química, el transporte y el procesamiento, dada la alta demanda en los productos plásticos ha resultado en una alta exposición continua mediante la ingesta, inhalación y absorción (Shoei-Lung y cols., 2012; Sonavane y cols., 2019; Sarria y cols., 2019; Vandenberg y cols., 2007).

Desde 1999, se han realizado diversos estudios para valorar la acumulación del BPA en los tejidos y fluidos del ser humano, se han reportado concentraciones de 0.2 a 20 ng/mL en el suero humano, en el fluido amniótico se reportó una concentración de 8.3 ng/mL a los 4 a 5 meses de gestación (Vandenberg y cols., 2007). En otros estudios se ha reportado un promedio de 11.2 ng/g en el tejido placentario, por otra parte, en la leche materna se ha reportado una concentración

de 0.28 a 0.97 ng/mL, en un estudio realizado con 23 mujeres sanas (Vandeberg y cols., 2007).

A partir del biomonitoreo de la exposición del BPA en poblaciones de Estados Unidos de América (EUA), se determinó un consumo diario de 25 ng/Kg/día, siendo hasta una concentración de 50 µg/Kg/día considerado como no dañino por la Administración de Drogas y Alimentos de EUA (FDA, de sus siglas en inglés) así como de la Agencia de Protección al Medio Ambiente de EUA (EPA, de sus siglas en inglés). En diversos estudios reportan que la exposición a dichas concentraciones o menores en humanos y animales experimentales durante los periodos de gestación y lactancia generan efectos adversos para la salud del individuo (Sonavane y cols., 2019).

Dentro de los resultados reportados están defectos al nacimiento como cambios en la distancia anogenital en humanos y en animales experimentales; la aparición de desórdenes mentales y reproductivos, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y respiratorias, así como cáncer (Sonavane y cols., 2019; Vendenberg y cols., 2020).

En estudios realizados en México, se han reportado concentraciones urinarias de BPA en mujeres gestantes similares a lo reportado en los Estados Unidos de América, lo que se acentúa en mujeres de bajos ingresos (Mandel y cols., 2019). El BPA en México está presente en botellas para bebé y contenedores para alimentos que se calientan o cocinan en microondas. Sin embargo, la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) no ha tenido ningún impacto en la regulación de la exposición al BPA (Mandel y cols., 2019).

Se debe destacar que a nivel nacional existe una falta de estudios, algunos de los analizados para este trabajo de tesis carecen de técnicas analíticas adecuadas que den certeza acerca de los resultados obtenidos; lo que aunado a poca o nula educación sanitaria con respecto al uso y problemas del BPA en la población, ha dificultado la regulación de su uso en México; dado los efectos disruptivos endocrinos del BPA es relevante tener una política acerca de su uso (Mandel y cols., 2019).

II. El Bisfenol A.

Compuesto de dos anillos de benceno y dos sustituyentes (4,4')-OH, que les permiten la unión a receptores a estrógeno alfa y beta, esto les confiere una actividad agonista nuclear a los receptores a estrógeno (RE); así como a los receptores membranales, aunado a esto cuenta con actividad antagonista para el receptor para hormonas tiroideas (Vendenberg y cols., 2020; Sarria y cols., 2019).

La metabolización del BPA genera tres metabolitos principales, el BPA-glucoronido, el BPA-sulfato y por último el metabolito (4-metil-2,4,bis (4-hidroxifenil) pent-1-ene) o mejor conocido como MBP (de sus siglas del inglés), siendo este último el de mayor relevancia biológica por su alta capacidad de interacción con los RE (Vendenberg y cols., 2020).

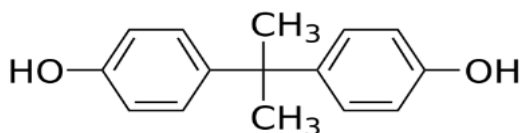


Figura 1. Estructura química del Bisfenol A
(Modificado de Sarria y cols., 2019)

Debido al gran número de vías de señalización que son afectadas por el BPA, este es considerado como un disruptor endocrino de alta importancia para los estudios de este contaminante y de sus efectos biológicos (Vendenberg y cols., 2020; Sarria y cols., 2019).

En un estudio el BPA mostró que altera la respuesta tisular a estrógenos, la progesterona, a los andrógenos y a la oxitocina, genera un aumento de la actividad de la enzima aromatasa y por ende de estradiol (Vendenberg y cols. 2020). Se ha mostrado también un aumento en la transcripción de receptores prostáticos andrógenos en tejido fetal de ratones aumentando su sensibilidad (Vendenberg y cols., 2020). El MBP se ha reportado con alta capacidad de unión a la globulina de unión a las hormonas sexuales, alterando la concentración de andrógenos y estrógenos en sangre (Vendenberg y cols., 2020).

Con base a estos hallazgos se ha estudiado la exposición a diferentes concentraciones de BPA en animales experimentales desde ng/Kg/día hasta los $\mu\text{g/Kg/día}$, reportando alteraciones en diversas estructuras como la próstata, alteraciones en la diferenciación de espermatogonias en la etapa fetal, las glándulas mamarias, el epitelio uterino, así como en los ovarios; lo que genera alteraciones en la vida reproductiva a concentraciones de 25 ng/Kg/día y mayores, reportando una disminución en la fertilidad y de la fecundidad en ratones (Vendenberg y cols., 2020).

Con respecto a diversas estructuras cerebrales se ha mostrado que en bajas dosis la administración de BPA en ratas y monos inhibe la estimulación estrogénica en el hipocampo y la corteza prefrontal, asociado a alteraciones de la memoria. Efectos estrogénicos agonistas y antagonistas han sido reportados en células pituitarias de ratas a concentraciones de 2.3 fg/mL (Vendenberg y cols., 2020).

Evaluaciones a ratas expuestas a BPA en el periodo perinatal han mostrado afectaciones en la memoria, en las pruebas del laberinto acuático de Morris y en el reconocimiento de objetos. Por otra parte, se mostró un menor número de células piramidales en la región CA1 del hipocampo junto a una menor expresión de los receptores a estrógenos α (Wu y cols., 2020). Por otra parte, las administraciones subcutáneas de BPA a una concentración de 5 y 50 mg/Kg en crías de 30, 45 y 60 días postnatales mostró un incremento en el peso corporal, retraso en la apertura vaginal, parámetro que marca el inicio de la pubertad en las hembras; además de una disminución en el peso relativo de los ovarios y un aumento del peso del hígado en comparación con el grupo control (Ahsan y cols., 2018). Se ha reportado que el número de ratas que logran tener un parto exitoso disminuye conforme se incrementa la dosis de BPA administrada (Ahsan y cols., 2018).

III. Conducta Materna.

El cuidado que es brindado a los organismos inmaduros antes del destete, por miembros de su grupo social que permiten la supervivencia de los recién nacidos, es llamado cuidado parental.

El cuidado específico que es brindado por el padre biológico se le conoce como conducta paternal (CP), mientras que la conducta materna (CM) son los cuidados específicos que son brindados por la madre biológica (Melo y cols., 2023).

Biológicamente, el cuidado brindado por la madre es el de mayor relevancia en los mamíferos, siendo una conducta de alta conservación entre las especies, que, consiste en la expresión de diversas conductas al final de la gestación, durante el parto y después del parto para brindar nutrientes, calor y protección; así como estímulos táctiles, auditivos y olfativos (estímulos sociales) que permiten el desarrollo metabólico, afectivo, cognitivo, neuroendocrino, inmune, reproductivo, social y conductual (Melo y cols., 2023).

Un aumento en el nivel de estrógeno, progesterona y prolactina prepara al cuerpo de la madre para las subsecuentes conductas para el cuidado de las próximas crías. De hecho, el inicio de la CM se da mediante un cambio en los niveles de dichas hormonas, lo que implica cambios neurobiológicos, neuroendocrinos y neuroquímicos en la madre (Melo y cols., 2023).

Los intercambios sensoriales y sociales entre la madre y los recién nacidos dan mantenimiento a la CM, permitiendo proveer de los cuidados necesarios y flexibles que requieren las crías, dependiendo del tamaño de la camada, así como la edad de las crías. La conducta materna cambia con la edad de las crías de tal forma que a lo largo de los 21 días tiene un pico en los cuidados que van disminuyendo al paso de los días (Melo y cols., 2023).

i. Conducta materna en roedores.

Las conductas parentales en roedores se desarrollan como múltiples patrones motores estereotipados secuenciados, que se acompañan de la supresión de otras actividades como son la alimentación o la reproducción (Yu y cols., 2020).

Durante los últimos días de la gestación y durante el periodo de lactancia, las madres tendrán altos niveles de agresión en contra de intrusos, en orden de defender el nido y a sus crías, tal nivel de agresión dependerá del tamaño de la camada y de la disponibilidad de agua y alimento (Yu y cols., 2020).

La aparición y el mantenimiento de la CM es modulada por diversas señales externas e internas; siendo las ratas, roedores de actividad nocturna, la identificación y localización de las crías es principalmente a través de la vía olfatoria y auditiva (Yu y cols., 2020).

Para brindar una identidad única y poder localizar a las crías la madre usa los aromas de la leche y de la orina como señales clave olfatorias; así como señales auditivas a través de vocalizaciones ultrasónicas, emitidas por las crías ante la ausencia de la madre o cuando estas están apartadas del nido (Yu y cols., 2020).

Las crías son además fuente de señales somatosensoriales en forma de tacto, visión y temperatura las cuales contribuyen al vínculo madre-cría. Dentro de las conductas que se desarrollan a lo largo de la gestación, el parto y el periodo de lactancia en las ratas son las siguientes:

a) La construcción del nido. Es una conducta materna activa, la primera en aparecer en el periodo preparto, se desarrolla mediante el acarreo del material para el nido por parte de la madre, entre los materiales se usan papel, madera o paja, para empujarla con sus patas o cuerpo en dirección a una esquina de la caja materna; el nido generalmente se evalúa midiendo la altura de las paredes que lo componen (Melo y cols., 2023).

b) La placentofagia. Durante el parto la madre lleva a cabo conductas de limpieza, mediante el lamido corporal y anogenital de las crías, con lo que

consume las membranas amnióticas, el líquido amniótico, las placentas y los cordones umbilicales de las crías (Melo y cols., 2023).

c) El agrupamiento de las crías. Este es un proceso activo que involucra el acarreo de las crías hacia el nido o su cercanía, es una actividad motivada por las señales sociales emitidas por las crías, donde la madre las reúne usando su hocico para así poder posicionarlas en el nido, además ayuda a la termorregulación de la camada (Melo y cols., 2023).

d) El lamido corporal y anogenital de las crías. Esta conducta se distingue por la activa participación de la madre, la cual lame a las crías de la cabeza hacia el tronco, para concluir en la zona anogenital, es observable por los amplios movimientos que realiza la madre con el hocico, la lengua y las extremidades anteriores. Durante el lamido de la zona genital se observa inmovilidad de las crías y una apertura de las extremidades posteriores (Melo y cols., 2023). La madre consume la orina al lamer, lo que reemplaza el agua y electrolitos perdidos durante el amamantamiento. Esta conducta de lamido participa también en el desarrollo de las crías, promoviendo la diferenciación sexual que impactará en la conducta sexual adulta de las crías (Melo y cols., 2023).

e) La conducta de lactancia o amamantamiento. Cuando la madre agrupa a las crías dentro del nido, procede a colocarse sobre ellas, permitiendo a las crías la búsqueda de las mamas, una vez que una o dos crías comienzan a succionar de ellas la madre toma una postura de amamantamiento en dorsiflexión, eventualmente eleva la espalda, caracterizada por un arco pronunciado de la espalda con las cuatro extremidades extendidas, esta posición se conoce como cifosis. Es durante el amamantamiento en esta posición que se libera la mayor cantidad de leche materna hacia las crías (Melo y cols., 2023).

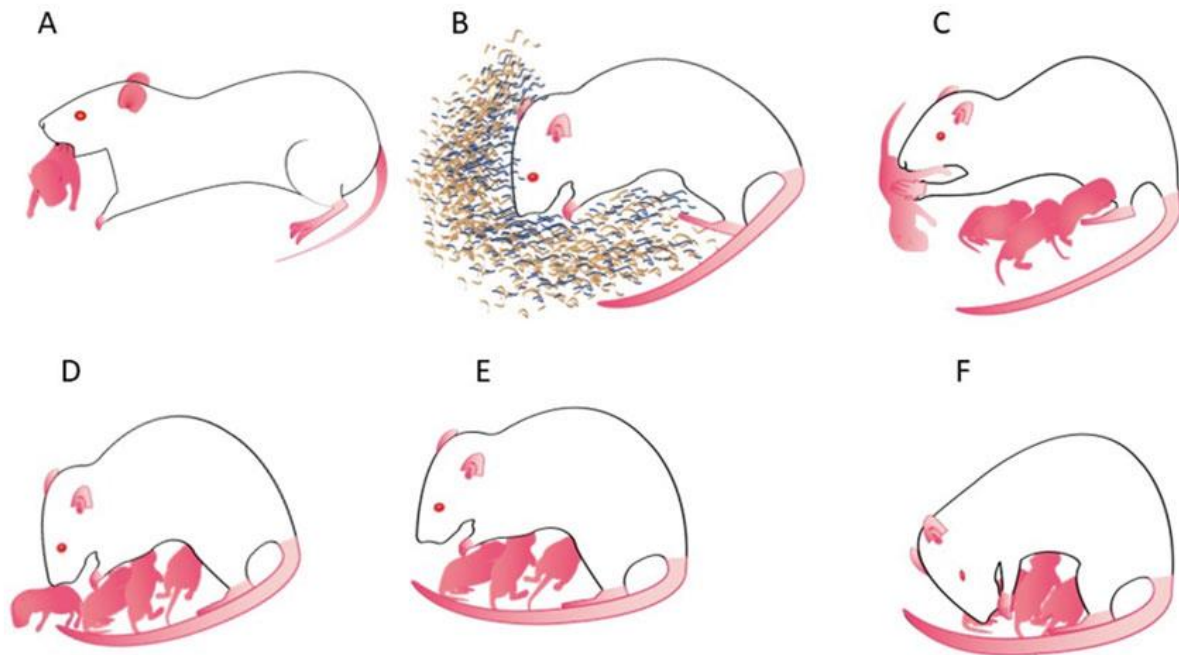


Figura 2. Esquemática de los principales componentes de la conducta materna en la rata. (A) Acarreo. **(B)** Construcción del nido. **(C)** Lamido anogenital. **(D)** Lamido corporal y sobreposición sobre las crías. **(E)** Amamantamiento de baja intensidad. **(F)** Cifosis o amamantamiento de alta intensidad. (Modificada de Melo y cols., 2023).

Es importante el mantenimiento y/o la calidad de los cuidados maternos ya que pueden verse alterados por una gran variedad de estresores medioambientales, como son la privación del agua y la comida, cambios en la iluminación, altas o bajas temperaturas, un ambiente con presencia de ruidos intensos; lo que puede llevar a una disminución de las conductas maternas o incluso al infanticidio y el canibalismo (Yu y cols., 2020).

ii. Áreas cerebrales involucradas en la conducta materna.

Existen diversas áreas cerebrales involucradas en la regulación de la conducta parental, dentro de las que podemos destacar el sistema olfatorio y el auditivo, el hipotálamo, el área ventral tegmental (AVT), el núcleo acumbens (NAc), la sustancia gris periacueductal (SGP), y la corteza prefrontal medial (CPm); (Yu y cols., 2020).

Todas estas regiones tienen un alto nivel de interconectividad, lo que permite el procesamiento sensorial de las señales provenientes de las crías, su integración y regulación de acuerdo al sexo del individuo, su estado fisiológico y contextual, la motivación, la respuesta motora; así como el control conductual para la ejecución de las conductas parentales, como son la construcción del nido, el acarreamiento de las crías, los lamidos corporales y genitales, lo que favorecerá el correcto desarrollo de las crías (Yu y cols., 2020; Kohl y cols., 2016).

A continuación, se realiza una breve descripción de las principales estructuras neurales involucradas en la conducta materna.

a) El epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal (EO y OVN). Las señales olfatorias facilitan el inicio de los cuidados parentales, estas son censadas en los roedores en células especializadas para el reconocimiento de los aromas en el EO y OVN enviando la información hacia el bulbo olfatorio principal (BOP) y hacia el bulbo olfatorio accesorio (BOA), respectivamente (Yu y cols., 2020; Kohl y cols., 2016). La detección de señales por el OVN con procesamiento en la amígdala medial y el núcleo del lecho de la estría terminal son esenciales para la agresión materna (Kohl y cols., 2016).

b) La corteza auditiva. La detección de las vocalizaciones ultrasónicas emitidas por las crías se da en la corteza auditiva derecha, aumentando la respuesta neural después del parto, con una mayor correlación señal–sonido en ratas madres en comparación con las respuestas de las ratas nulíparas (Yu y cols., 2020).

c) La amígdala medial (AM): Interconectada con el BOP y el BOA. La AM procesa la información olfatoria recibida de estas estructuras, teniendo una alta activación en conjunto con el bulbo olfatorio accesorio en padres vírgenes, sugiriendo un papel a la aversión hacia las crías (Yu y cols., 2020). Se ha mostrado que la estimulación de neuronas GABAérgicas, en la división posterodorsal de la amígdala medial promueve el aseo de las crías por parte de la rata madre, en machos vírgenes la misma estimulación puede provocar un bajo nivel de aseo a las crías y un alto nivel de infanticidio lo que soporta su rol en el reconocimiento (Yu y cols., 2020).

d) El área preóptica medial (APM). Ubicada en la región anterior del hipotálamo, el APM es una de las regiones de mayor estudio en el control de la conducta materna; la inhibición de esta estructura farmacológicamente o mediante lesión, induce una inhibición de amplio rango de los cuidados maternos en la rata, principalmente los componentes motores de la conducta materna; por otra parte, en ratas macho vírgenes la activación de esta región disminuye el nivel de infanticidio (Yu y cols., 2020; Kohl y cols., 2016).

Es relevante que la información multisensorial tiene su lugar de integración en el APM, donde una correcta evaluación del estado interno de las crías permite desplegar las conductas apropiadas para su cuidado y por ende su supervivencia. Así las proyecciones al NAc, a través del campo retrorubral y el AVT median la respuesta parental (Kohl y cols., 2016). Por otra parte, el APM es una región heterogénea de grandes poblaciones celulares con diferentes funciones que actúan con diferentes sustancias como es la galanina, estas neuronas tienen una alta actividad durante el despliegue de conductas maternas de contacto directo como son el acarreo y el aseo de las crías, esto es, promueve el cuidado activo hacia las crías (Yu y cols., 2020).

Se ha teorizado, que el control de los procesos involucrados en la conducta materna se debe a distintas poblaciones neuronales con identidades moleculares distintas. Wu y cols., (2020) han reportado que son las neuronas secretoras de galanina en el APM las que mantienen el correcto despliegue de la conducta materna (Kohl y cols., 2016). Además de que las neuronas con receptores a estrógenos α en el APM, facilitan la aparición del acarreo en las madres (Yu y cols., 2020).

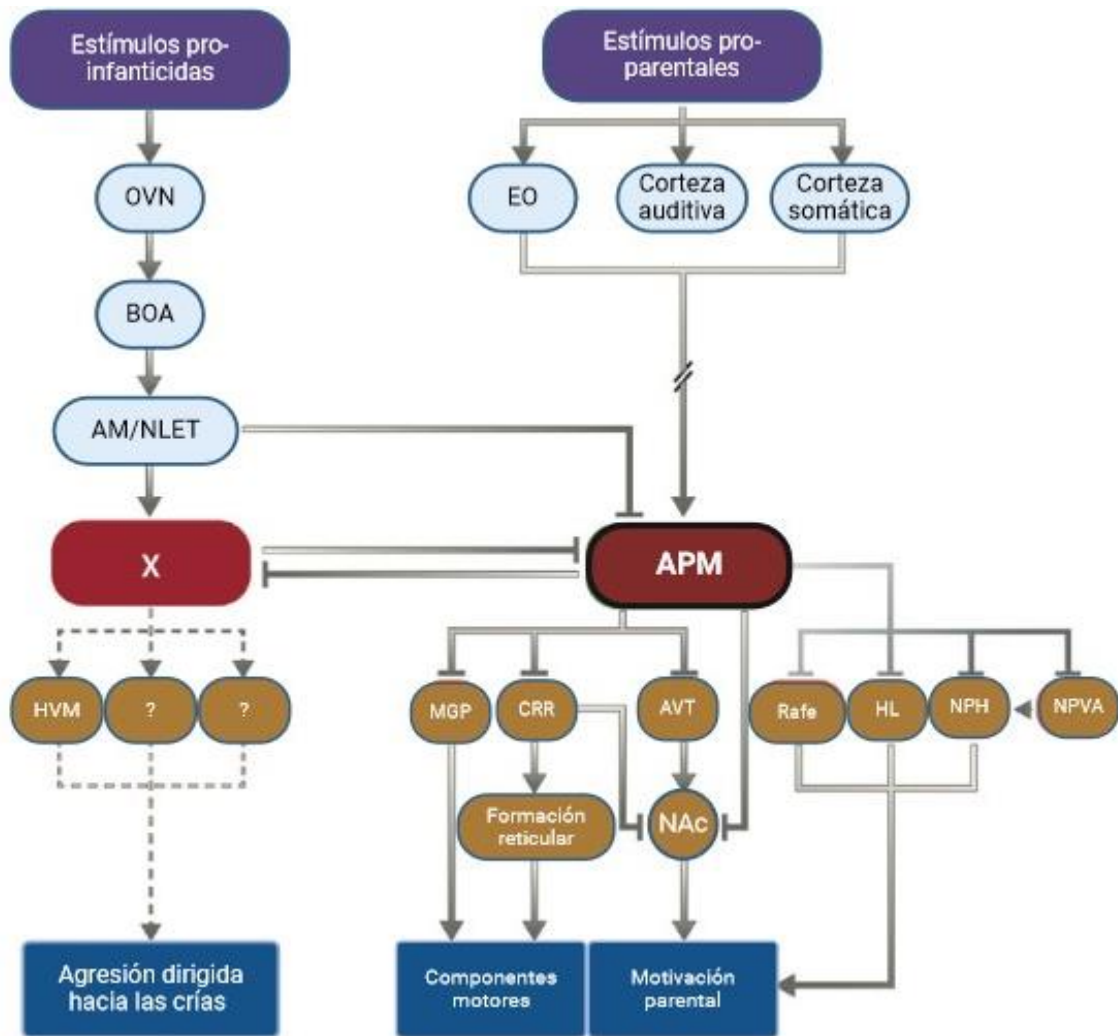


Figura 3. Circuito neuronal de la conducta parental, estímulos pro-infanticidas o pro-parentales dependiendo del estado interno del animal. En el lado izquierdo están las áreas involucradas en el infanticidio. En el lado derecho las que promueven los cuidados parentales.

BOA, bulbo olfatorio accesorio; NPVA, núcleo periventricularanteroventral; NLET, núcleo del lecho de la estria terminal; HL, habernula lateral; AM, amígdala medial; EO, Epitelio olfatorio; APM, área preóptica medial; NAc, núcleo accumbens; MGP, materia gris periacueductal; NPH, núcleo paraventricular del hipotálamo; CRR, campo retrorubral; HVM, hipotálamo ventromedial; OVN, órgano vomeronasal; AVT, área ventral tegmental. Elaborado a partir de un esquema de (Modificado de Kohl y cols., 2016).

e) El área ventral tegmental (AVT). Es la encargada de enviar aferencias dopaminérgicas hacia el NAc, para la motivación y el reforzamiento del aprendizaje. Su inactivación o las lesiones de este núcleo, así como la administración de agonistas para la dopamina en el AVT, reduce el lamido y el acarreo hacia las crías durante la lactancia (Yu y cols., 2020).

f) La materia gris periacueductal (MGP). Es la que transmite señales motoras para el despliegue de las conductas maternas, siendo las neuronas galaninérgicas del APM las que envían proyecciones hacia las neuronas GABAérgicas del a MGP, lo que induce una disminución de la agresividad hacia las crías en machos vírgenes, además de promover la limpieza y olfateo de las crías tanto en machos como en las hembras (Yu y cols., 2020).

g) El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPH). Lesiones en periodos tempranos de la gestación alteran la conducta materna, siendo el NPH, una estructura encargada de la regulación temprana de la conducta materna; pero no de su mantenimiento a largo plazo, siendo la oxitocina un neuropéptido crítico para la regulación de estos procesos (Yu y cols., 2020).

h) La corteza prefrontal medial (CPM). Es la encargada de las funciones cognitivas de alto valor. Se ha mostrado un aumento en los niveles de oxigenación sanguínea en respuesta al inicio del amamantamiento. Además, se ha reportado una interrupción de las conductas maternas por la administración de tetrodotoxina que inactiva esta área cerebral, o bien por lesiones citotóxicas en administraciones en la corteza prefrontal medial (Yu y cols., 2020).

iii. Neurotransmisores involucrados en la regulación de la conducta materna.

A continuación, se describe sucintamente los principales sistemas de neurotransmisores que participan en la conducta maternal.

a) La dopamina (DA). Está involucrada en la inducción y mantenimiento de la conducta materna. Se ha mostrado que la estimulación de la DA a través del

receptor D1 en el NAc inicia la conducta materna, mientras que la administración de antagonistas para este receptor en el AVT y el APM interfirió la aparición de la conducta materna (Bridges y cols., 2015). Con base en estas evidencias se ha propuesto a la DA como un estimulante de los mecanismos de recompensa que provienen desde las crías hacia la madre (Bridges y cols., 2015). En ratas con alteraciones de la comunicación dopaminérgica, la administración de antagonistas o de inhibidores enzimáticos interfirieron con la conducta materna como lo es la placentofagia o el acarreo de las crías (Bridges y cols., 2015).

b) La norepinefrina (NE). En ovejas, el bloqueo de los receptores β adrenérgicos en el bulbo olfatorio alteró el reconocimiento olfatorio de las crías, además de que la norepinefrina es un mayor estimulante durante el parto para la aparición de la placentofagia y el acarreo (Bridges y cols., 2015).

c) La serotonina (5-HT). Se ha mostrado que las lesiones en el núcleo de rafé dorsal y en el rafé medio alteran las respuestas orientadas hacia las crías en el periodo postparto y el desempeño durante el amamantamiento. La serotonina tiene un rol regulador de la prolactina, además de que una disminución en la producción de serotonina lleva a un pobre desempeño del cuidado materno (Bridges y cols., 2015).

iv. Hormonas involucradas en la conducta materna.

El sistema endocrino regula y modifica la conducta de las madres durante la gestación, el parto y la lactancia mediante la liberación de diversas hormonas; alguno de los cambios más significativos se da por un aumento en los niveles de estradiol, la progesterona, la prolactina, así como los lactógenos placentarios (Bridges y cols., 2015).

a) Los estrógenos. El 17β -estradiol (E_2), la caída de progesterona y el incremento de estrógenos postparto son lo que induce la conducta maternal. Una combinación de estradiol, progesterona y prolactina, inducen la conducta materna en mamíferos a través de su unión con el receptor a estrógeno alfa.

Una búsqueda del sitio de acción del estradiol demostró que la estimulación directa bilateral con estradiol diluido en implantes en el APM en ratas ovariectomizadas y en ratas a las que se les interrumpió la gestación, produjeron respuestas de latencia corta hacia las crías (Bridges y cols., 2015).

b) La progesterona (P). Hormona esteroidea sintetizada en las hembras en los cuerpos lúteos o amarillos en los ovarios y en la glándula adrenal en los varones, es necesaria para el mantenimiento del embarazo, ya que el bloqueo específico de receptores a P genera abortos en humanos y en varios modelos animales (Arck y cols. 2007).

Se ha propuesto un papel regulatorio de la progesterona, sensibilizando al cerebro gestante hacia los estímulos de las crías durante el parto y controlando los tiempos de aumento en la responsividad a través de los receptores nucleares A y B; siendo una mayor exposición a la progesterona una forma de preparación del cerebro para dar inicio al cuidado de las crías una vez los niveles de esta descienden durante el parto y el incremento concomitante de estradiol (Bridges y cols., 2015; Arck y cols., 2007).

La búsqueda de un sitio de acción de la progesterona está aún en debate, aunque estudios han sugerido que el área dorsal del APM puede ser el lugar para el papel inicial de la progesterona durante la gestación. Uno de los mecanismos de acción propuestos es mediante factores de transcripción nuclear dependientes de ligando mediados por el receptor para la progesterona (Bridges y cols., 2015).

c) La prolactina (PRL) y los lactógenos placentarios (LPs). La prolactina se ha estudiado como una hormona de inducción para la conducta materna en la rata, actuando a través de los receptores para la prolactina en el plexo coroideo para su transporte hacia el fluido cerebroespinal. En ratas gonadotemizadas, la estimulación con PRL en el APM produjo un inicio rápido a las conductas maternas. Los lactógenos placentarios, se secretan de manera preponderante en la segunda mitad de la etapa gestacional en las ratas, así como en las mujeres; poseen una acción conjunta con la prolactina y el estradiol en inducir las conductas maternas (Bridges y cols., 2015).

Tabla 1. Manipulaciones farmacológicas y génicas que modifican la conducta parental.

Intervención farmacológica		
Factor	Área cerebral	Efecto en la conducta parental
Estrógeno	APM	Acarreo mejorado
Oxitocina	Corteza auditiva	Acarreo mejorado
Oxitocina	APM, AVT	Acarreo mejorado
Vasopresina	Intracerebroventricular	Acarreo mejorado
Prostaglandinas	Intracerebroventricular	Acarreo mejorado
Prolactina	APM	Acarreo mejorado
Antagonista para el receptor a dopamina	Núcleo accumbens	Acarreo mejorado
Agonista para el receptor a GABA	Septum lateral	Aumento de la agresión materna
Factor liberador de corticotropina	Septum lateral	Disminución de la agresión materna
Animales variantes del gen para:		
Gen	Efecto en la conducta parental	
Receptor para la prolactina	Acarreo alterado en hembras vírgenes Reconocimiento de las crías alterado en los padres.	
Receptor a estrógenos α	Aumento en la tasa infanticidio.	
Receptor a GABA δ	Acarreo y supervivencia de las crías reducido.	
Factor de liberación del receptor a corticotropina 2	Agresión materna disminuida.	
Dopamina beta-hidroxilasa	Disminución en el acarreo materno y de la supervivencia de las crías.	

APM, Área preóptica media, AVT, Área ventral tegmental. (Modificado de Kohl y cols., 2016).

IV. Bisfenol A y sus efectos.

i. Endócrinos.

a) Los receptores a estrógenos (RE). El BPA tiene la capacidad de unión a los receptores α y a los receptores β , con una mayor afinidad para los receptores β , con una capacidad de respuesta a bajas concentraciones (Vandenberg y cols., 2007). La administración o exposición del BPA es comparable a la potencia del estradiol en alterar las respuestas celulares, esto debido a su capacidad de unión a receptores de membrana estrogénicos clásicos y no clásicos, así como al receptor acoplado a proteína-G (RPG) del tipo GPR30 (Rubin y cols., 2011).

La exposición temprana al BPA altera la diferenciación sexual en ratas recién nacidas debido a su capacidad de unión a los tejidos sensibles a estrógenos durante la gestación, ya que tiene poca afinidad a la alfa fetoproteína, encargada de limitar la acción de los estrógenos en los tejidos (Rubin y cols., 2011).

b) La hormona tiroidea (HT). Alteraciones en la embriogénesis y el desarrollo neonatal se han reportado como parte de la inhibición o alteración de la vía de acción de la HT ante la exposición a BPA, una hormona esencial para el desarrollo, el crecimiento y el metabolismo de los seres vivos (Rubin y cols., 2011; Kim y cols., 2019). El BPA actúa como un antagonista para los receptores tiroideos, compite en la unión a proteínas transportadoras de HT y limita la síntesis hormonal. Resultados de estudios en ratas recién nacidas indican un aumento en los niveles de la tiroxina, considerado por una falta de retroalimentación negativa ante la falta de unión al receptor de la HT por la administración de BPA a concentraciones 1, 10, 50 mg/Kg/día durante la gestación y la lactancia (Rubin y cols., 2011; Kim y cols., 2019).

En ratones la exposición a BPA disminuyó los niveles de tiroxina durante la etapa de la pubertad. Existe la posibilidad que el BPA altere directamente a la glándula tiroides, ya que se ha reportado en estudios en animales cambios histológicos y en el peso de la glándula tiroides (Kim y cols., 2019).

c) Los receptores a glucocorticoides (RG). Existe evidencia que el BPA puede alterar el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), alterando las concentraciones de cortisol durante el embarazo en mujeres las cuales tienen altas concentraciones de BPA en la orina y generando una disminución del cortisol sérico en varones prepuberales (Mustieles y cols., 2020). Se considera al BPA como un agonista para los receptores a glucocorticoides, por su capacidad estimulante del RG en las células 3T3-L1, dando paso a un aumento en la adipogénesis. Por otra parte, la administración de BPA a concentraciones 40 µg/Kg/día en ratas genera un aumento en los niveles basales de corticosterona (Rubin y cols., 2011).

ii. Neuronales.

Diversos estudios han reportado que el BPA altera el delicado equilibrio del desarrollo neural, alterando la plasticidad sináptica, inhibiendo la neurogénesis y aumentando la producción de las especies reactivas de oxígeno (Santoro y cols. 2019). Por ejemplo, la inhibición de la neurogénesis se ha reportado en ratones tratados con 20 mg/Kg/día de BPA, por la supresión de la proliferación de las células neuroepiteliales progenitoras, encargadas de iniciar la neurogénesis, afectando principalmente al giro dentado (GD). Estudios similares en ratas han reportado que el BPA induce apoptosis en el giro dentado y en el hipocampo (Santoro y cols., 2019).

La exposición al BPA aumentó el estrés oxidativo y la apoptosis en un periodo que va del día 21 postnatal al día 90 postnatal (Santoro y cols., 2019). De hecho, se tiene evidencia que los efectos adversos por la exposición a BPA persisten a través de las generaciones, en la generación F2 de ratones gestantes expuestos a 10 mg/Kg/día de BPA, intraperitonealmente, se tuvo una menor generación de neuronas en el hipocampo (Santoro y cols., 2019).

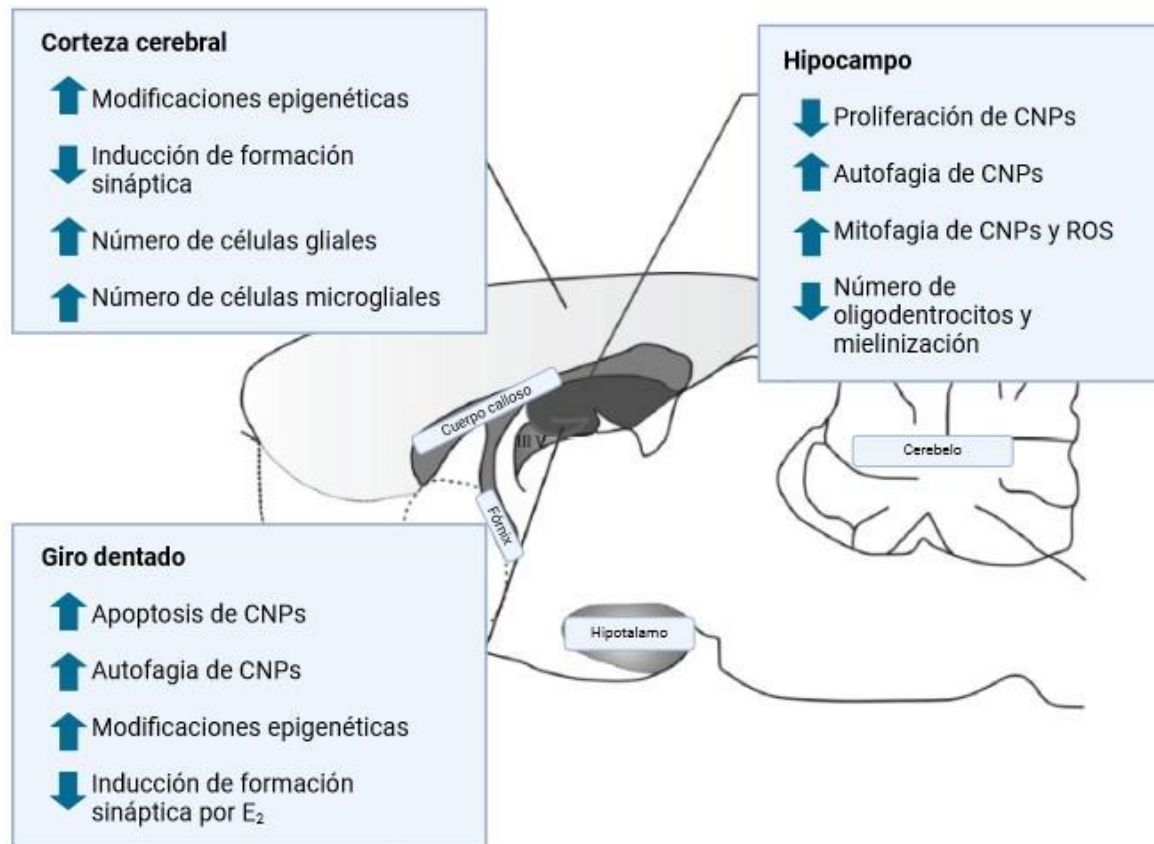


Figura 4. Esquematización de los principales efectos del Bisfenol A en el cerebro de roedores. Hallazgos de los efectos del Bisfenol A en diferentes áreas cerebrales en ratas. E₂, estradiol; CNPs, células neuroepiteliales progenitoras; ROS, especies reactivas de oxígeno (Modificado de Santoro y cols., 2019).

Dada la naturaleza lipofílica del BPA, esta molécula puede atravesar la barrera hematoencefálica y la barrera placentaria, confiriéndole la capacidad de alteración neuronal en diversas etapas de la vida. La administración oral de BPA desde el día 5 postnatal hasta el día 21 postnatal produjo una hiperactividad en crías y en ratas juveniles a las 5 semanas de edad (Santoro y cols., 2019).

En roedores que han sido expuestos a BPA usando la prueba del laberinto de Barnes en Y, el laberinto radial y el laberinto acuático de Morris, durante los periodos perinatal, postnatal, prepuberal y durante la pubertad se produjeron afectaciones en los procesos de memoria y en el aprendizaje en los animales expuestos a este xenobiótico (Santoro y cols., 2019).

A pesar de la complejidad que representa la exposición al BPA hay pocos estudios en mamíferos de gran tamaño, pero un estudio en monos mostró que la exposición al BPA disminuyó tanto la precisión de la memoria de trabajo, como el número de entradas sinápticas excitadoras en las neuronas piramidales dentro de la corteza prefrontal y en el hipocampo (Elsworth y cols., 2015). Así como, en un estudio en humanos se mostró un incremento en la hiperactividad, la ansiedad y una mayor frecuencia en los comportamientos depresivos en mujeres, los cuales fueron relacionados con altos niveles de BPA maternos en la orina, pero no se obtuvo este efecto en los hombres, lo que hace necesario estudios en ambos sexos (Santoro y cols., 2019).

V. Modelos animales para el estudio de la conducta materna y el neurodesarrollo temprano.

Un modelo animal, es definido por Held como *“Un organismo vivo en el cual la normativa biológica o conductual puede ser estudiada, o en el cual un proceso patológico espontáneo o inducido puede ser investigado y en el cual el fenómeno en uno o más aspectos se parece al mismo fenómeno en humanos u otras especies animales”* (Subramanian y cols., 2022). Los modelos animales son una herramienta vital en el actuar científico, basado en las características de la línea evolutiva de las especies, así como en la similitud morfológica y los mecanismos fisiológicos y conductuales que son similares (Subramanian y cols., 2022; Gómez y cols., 2002). Lo cual permite evaluar nuevas opciones terapéuticas, establecer sus rangos seguros o su toxicidad, su farmacocinética, así como la aparición y evolución de síndromes y enfermedades (Subramanian y cols., 2022). La validación de los modelos animales varía de acuerdo con el tema de investigación y el propósito de esta, debiendo cumplir con criterios de validación, es decir, una similitud fenotípica (validez aparente), donde la sintomatología del fenómeno estudiado en los animales es similar a la sintomatología en los humanos, existiendo una homología a nivel genético entre el modelo de estudio y el ser humano (validez de constructo); así como la probabilidad de evaluar qué tanto un

modelo puede predecir un aspecto desconocido de una terapia o patología presente en el ser humano (validez predictiva); (Subramanian y cols., 2022).

Los cuidados parentales son una conducta presente en los vertebrados e invertebrados, aunque es de alta preservación entre los mamíferos siendo la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) el mamífero no humano de mayor estudio en el área de la conducta materna, lo cual ha inspirado teorías en la conducta del humano como son la teoría del apego del psicoanalista John Bowlby (Ferreira y cols., 2012; Beery y cols., 2011). Existe un cambio profundo en la conducta de la rata, así como en distintos mamíferos gestantes justo antes del parto, debido a los cambios hormonales que dan inicio al circuito neural encargado de la aparición, regulación y mantenimiento de la conducta materna, siendo su mantenimiento debido a señales recíprocas entre la madre y las crías, en un sistema retroactivo (Ferreira y cols., 2012). El uso de la rata de laboratorio da paso a una evaluación cualitativa y cuantitativa de los componentes de la conducta materna lo que ofrece ventajas para el estudio de diversos xenobióticos incluyendo el BPA (Ferreira y cols., 2012).

Las investigaciones actuales han buscado entender cómo las variaciones en la conducta materna afectan el desarrollo a corto y largo plazo en los recién nacidos, dado que las alteraciones de componentes de la conducta materna, como variaciones del lamido corporal y genital alteran y moldean el eje HPA, desde sus componentes hormonales, así como celulares y conductuales (Beery y cols., 2011).

En humanos, el estrés maternal aunado a un nivel socioeconómico bajo alteran la calidad del amamantamiento, con menores rangos de inicio de amamantamiento, junto a una menor duración de este, lo cual se ha relacionado con la aparición de la obesidad infantil (Gross y cols. 2021).

i. Las ratas de bajo y alto bostezo.

En el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y el Control Motor, del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se cuenta con dos sublíneas de la rata Sprague-Dawley que difieren en su frecuencia de bostezo, las cuales fueron obtenidas por cruzamientos endogámicos. Las ratas de bajo bostezo o low-yawning presentan dos bostezos por hora en promedio y las ratas de alto bostezo o high-yawning con un promedio de 20 bostezos por hora (Urbá-Holmgren y cols., 1990).

Además, se ha descrito que el número de bostezos que presenta cada sublínea es sexualmente dimórfica, teniendo un menor número de bostezos por hora las hembras en comparación con los machos de cada sublínea (Urbá-Holmgren y cols. 1990).

Moyaho y cols., en 1995, mostraron a partir de la evaluación de las ratas de alto y bajo bostezo en el campo abierto, que las ratas de alto bostezo tienen una mayor actividad locomotora en comparación con las ratas de bajo bostezo, siendo indicativo de una diferente capacidad de respuesta a eventos estresantes como lo es la prueba del campo abierto, por tanto, resultan una herramienta de valor para el estudio de diferentes condiciones de alto estrés como es la gestación y la lactancia.

ii. Evaluación del neurodesarrollo motor en las crías de rata.

El estudio del desarrollo del sistema nervioso central en los recién nacidos requiere de modelos animales con un tiempo de desarrollo lo suficientemente largo para evaluar a detalle las etapas críticas de la maduración anatómica, celular, neuroquímica y metabólica; pero además lo suficientemente corto para realizar una valoración total de todas las etapas involucradas en el neurodesarrollo temprano (Clarac y cols., 1998).

La rata es así un modelo ideal para los estudios de neurodesarrollo, debido a que presenta periodos embrionarios y fetales de tres semanas, seguidos de un periodo de maduración postnatal de tres semanas, y con la que se cuenta con información detallada de sus características anatómicas y fisiológicas (Clarac y cols., 1998).

iii. Los reflejos motores.

Los reflejos motores se evalúan, con pruebas como las usadas en humanos recién nacidos para la valoración de su desarrollo neural y cognitivo. Dichos reflejos son movimientos neuronales involuntarios y estereotipados que demuestran la maduración de las redes corticales (Nguyen y cols., 2017).

Las crías de ratas al nacimiento son inmaduras (crías altriciales), sin la capacidad de llevar a cabo tareas motoras, cognitivas o sensoriales de alta complejidad, por tanto, son comúnmente usadas como modelos experimentales de neurodesarrollo. El desarrollo cerebral de las crías es principalmente postnatal, siendo el día postnatal 1 equivalente al cerebro de humanos de 23-28 semanas de desarrollo; mientras que las crías de 7 a 10 días postnatales son equivalentes al cerebro humano de un recién nacido (Nguyen y cols., 2017).

a) El reflejo de enderezamiento. Es la capacidad motora de controlar el tronco para pasar de una posición supina, a una posición en la que sus cuatro extremidades se apoyan sobre la superficie, con un promedio de su aparición en el día 5 al 10 postnatal, esta respuesta aparece en todos los sujetos (Feather-Schussler y cols., 2016).

b) La geotaxis negativa. Un reflejo conductual innato, con promedio de aparición el día 7 postnatal, con un rango del día 3 al 15 postnatal, permitiendo evaluar la coordinación motora en los roedores infantiles (Feather-Schussler y cols., 2016).

c) La evitación de bordes. Permite evaluar el reflejo laberintico así como la fuerza y la coordinación motora en las crías, puede ser evaluado desde el día 1 hasta el día 14 postnatal requiriendo los siguientes pasos: Preparar una superficie

plana elevada, colocar a la cría con las extremidades superiores (solamente las palmas), y la nariz sobre el borde, tomar el tiempo que toma a la cría alejarse del borde moviendo las cuatro extremidades hacia atrás y empleando su nariz como referente (Feather-Schussler y cols., 2016).

VI. Justificación.

La exposición al Bisfenol A, altera el desarrollo especialmente en etapas tempranas, dado que poseemos dos sublíneas de la cepa Sprague-Dawley que difieren en la respuesta al estrés, se pueden determinar los efectos de un contaminante de alta prevalencia como lo es el bisfenol A sobre la conducta de la madre y el desarrollo de sus crías (Shoei-Lung y cols., 2012; Sonavane y cols., 2019).

La exposición al bisfenol A altera el desarrollo especialmente en etapas tempranas por su capacidad de transferencia a través de la placenta, alterando el mantenimiento de la homeostasis corporal. Adicionalmente, este xenobiótico se ha propuesto que altera las vías de señalización endocrinas y la comunicación celular, relacionándose con la obesidad, abortos espontáneos, anormalidades cromosomales, algunos tipos de cáncer, enfermedades respiratorias y cardiovasculares, y diabetes mellitus (Shoei-Lung y cols., 2012; Sonavane y cols., 2019; Vendenberg y cols., 2020; Vendenberg y cols., 2007). Ha sido propuesto como un detonante en el aumento de enfermedades crónico-degenerativas, discapacitantes que merman el desarrollo social y genera altos costos para salud pública a largo plazo (Shoei-Lung y cols., 2012; Sonavane y cols., 2019; Vendenberg y cols., 2020; Vendenberg y cols., 2007).

VII. Hipótesis.

H1: La administración del bisfenol A afectará la calidad de la conducta materna en las ratas administradas en comparación con los controles de las sublíneas de alto y bajo bostezo.

H2: La administración de bisfenol A producirá un aumento en la duración de las pruebas para la evaluación del neurodesarrollo en las crías que recibieron tratamiento en la gestación y en la lactancia en comparación con las crías pertenecientes al grupo control en ambas sublíneas.

VIII. Objetivos.

I. General.

Realizar un estudio comparativo de los efectos de la administración del bisfenol A en la conducta materna y el neurodesarrollo temprano en las crías de las sublíneas de las ratas de alto bostezo y de bajo bostezo.

II. Específicos.

Evaluar los componentes de la conducta materna; el tiempo de amamantamiento de alta y baja intensidad; el tiempo de lamido corporal y genital además del acarreo, y determinar las diferencias por la administración de bisfenol A durante la gestación y la lactancia.

Evaluar los efectos de la administración de bisfenol A en etapas tempranas de la gestación y la lactancia sobre el neurodesarrollo de las crías de las sublíneas de alto y bajo bostezo con pruebas estandarizadas del desarrollo motor como son el enderezamiento, el reflejo de geotaxia negativa y el de evitación de bordes.

IX. Materiales y métodos.

i. Sujetos experimentales.

Se emplearon ratas hembra gestantes de las sublíneas HY (de las siglas en inglés, high-yawning) y LY (de las siglas en inglés, low-yawning) de 3 meses de edad ($n = 15$, crías $n = 112$), provenientes del bioterio de investigación del Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y el Control Motor del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Los sujetos experimentales se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas (encendido a las 0700), a una temperatura de 21 ± 2 °C, humedad relativa del 40 al 50%, con acceso de agua purificada Ciel™ (Coca-Cola® Co. México) y alimento balanceado para roedores (Labdiet, Purina Mills, Estados Unidos de América) *ad libitum*.

Todo manejo de los sujetos experimentales se realizó bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y siguiendo las reglas de los Institutos Nacionales de Salud de los EUA. El protocolo experimental fue aprobado por el comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, No. 0255/2021. Las ratas fueron transferidas al día 0 de gestación ante la presencia del botón seminal al área de experimentación para su posterior administración farmacológica y observación.

Las ratas permanecieron en jaulas de acrílico transparente (32 x 47 x 20 cm) con una cama de viruta de madera presurizada tipo chip (Aspen, Estados Unidos de América), con cambio dos veces a la semana.

ii. Administración farmacológica.

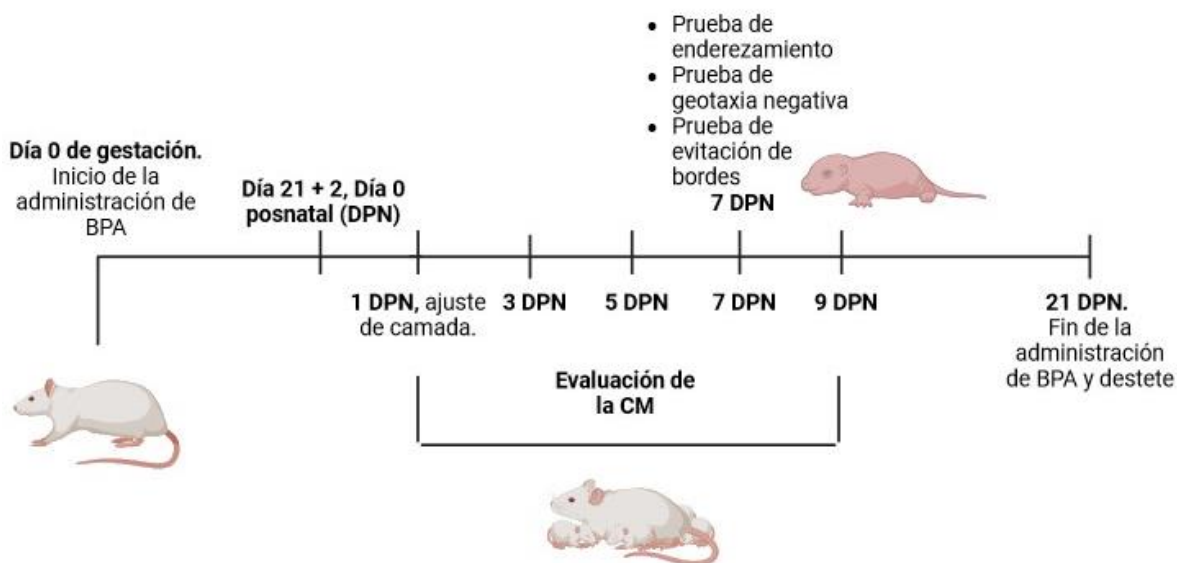


Figura 5. Esquema del diseño experimental. La administración del Bisfenol A se tuvo durante el embarazo y la lactancia. CM, Conducta materna, DPN, Día postnatal, BPA, Bisfenol A.

A partir del día 0 de gestación, hasta el día postnatal 21 se realizó la administración de Bisfenol A en una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ diluido en una concentración 0.05% de alcohol etílico en agua purificada Ciel™. Las ratas control recibieron una solución de 0.05% de alcohol etílico en agua purificada Ciel™ durante el mismo periodo de tiempo como se ilustra en la Figura 5.

iii. Evaluación de la conducta materna.

Las ratas fueron colocadas en cajas de acrílico cuando se observó el botón seminal (día 0 de gestación) y se inició la administración del Bisfenol A. Al día del parto (día 21+2 de gestación), se observó que el parto se llevara a cabo de manera correcta. Al día 1 postparto se realizó un ajuste de la camada para obtener 4 ± 1 crías macho y 4 ± 1 crías hembra para una camada total de 8 crías.

La observación de la conducta materna se llevó a cabo los días 1, 3, 5, 7 y 9 postnatal con duración de 20 minutos entre las 0900 horas y las 1200 horas en un cuarto sono-amortiguado, con una intensidad lumínica de 1000 lux.

Se realizó una segunda observación de 5 minutos para evaluar la conducta de acarreo, el observador retira con cuidado a la rata madre y procedió a dispersar a las crías fuera del nido evitando alterar el mismo; una vez terminada la dispersión se ingresa nuevamente a la madre y se inicia la observación. Todas las observaciones fueron grabadas con una cámara digital HD (Sony Modelo HDRPJ260V/BCE23) para su análisis posterior.

Las conductas evaluadas en la observación fueron las siguientes:

Latencia de acarreo de la primera cría: El tiempo en segundos que tarda la madre desde su ingreso a la caja hasta el acarreo de la primera cría hacia el nido.

Acarreo total de la camada: El tiempo en segundos que tarda la madre en acarrear la camada hacia el nido.

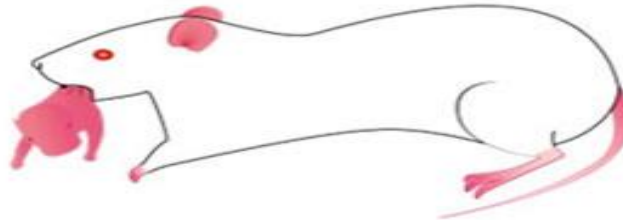


Figura 6. Esquematización del acarreo de las crías por parte de las madres. Note que la madre emplea su hocico para fijar a la cría en la piel del dorso del cuello e inducir su reflejo de inmovilidad.

Lamido corporal y genital de las crías: El tiempo en segundos que la madre emplea realizando la conducta de lamido corporal o el lamido genital de las crías.

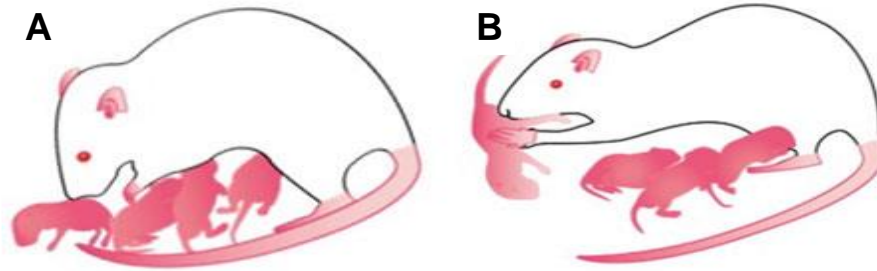


Figura 7. Esquema que muestra el lamido corporal y el genital de las crías. A) Del lado izquierdo se ilustra el lamido corporal B) De lado derecho se ilustra el lamido genital, notando que la madre gira a la cría tomándola del torso para poder acceder al área anogenital.

Tiempo total de amamantamiento de baja o alta intensidad (cifosis): El tiempo en segundos que emplea la madre en posición de amamantamiento de baja o alta intensidad.

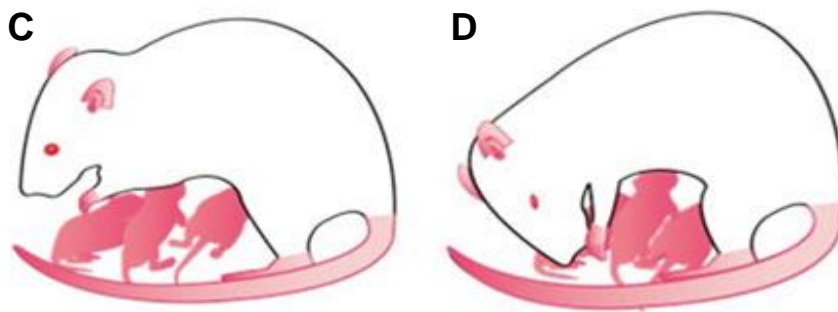


Figura 8. Esquema de la posición de amamantamiento de baja y alta intensidad. C) Posición de amamantamiento baja intensidad a la izquierda, D) Posición de amamantamiento de alta intensidad de lado derecho, donde se observa un arqueamiento pronunciado con apoyo de las cuatro extremidades.

iv. Evaluación del neurodesarrollo de las crías.

Prueba de enderezamiento: En el día postnatal 7 las crías fueron colocadas sobre su espalda en una superficie blanda y se tomó el tiempo requerido para colocarse en una posición en la que las cuatro extremidades tocaran la superficie (Lee y cols., 2020).

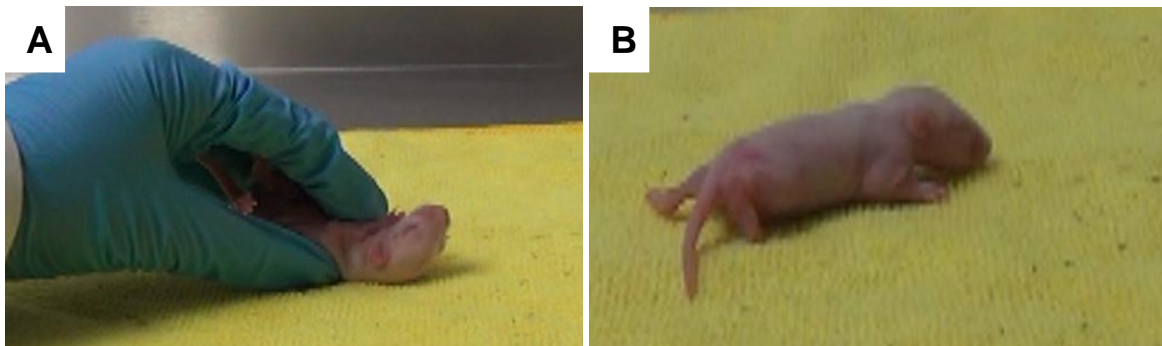


Figura 9. Ilustración de la prueba de enderezamiento. A) La cría se coloca sobre su espalda, **B)** El enderezamiento se evalúa cuando las cuatro extremidades tocan sobre la superficie.

Prueba de geotaxia negativa: En el día 7 postnatal las crías fueron colocadas en una posición en contra de la gravedad, sobre una estructura de madera con una inclinación a 30° y se tomó el tiempo que requirió la cría para tomar una posición que contrarresta la acción gravitatoria (Lee y cols., 2020).

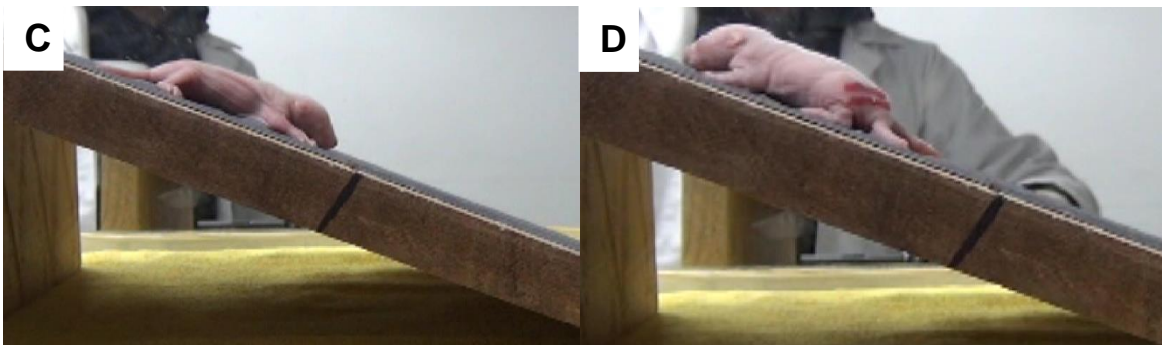


Figura 10. Prueba de geotaxia negativa. C) Colocación de la cría en contra de la acción de la gravedad, **D)** La cría adopta una posición anti-gravitatoria.

Prueba de evitación de bordes: En el día 7 postnatal las crías fueron colocadas en una plataforma de madera elevada a 10 cm sobre la base, se colocaron las extremidades delanteras y la nariz sobre el borde de la plataforma, formando una línea imaginaria entre la órbita de los ojos y se calculó el tiempo que transcurrió en alejarse del borde (Lee y cols., 2020).

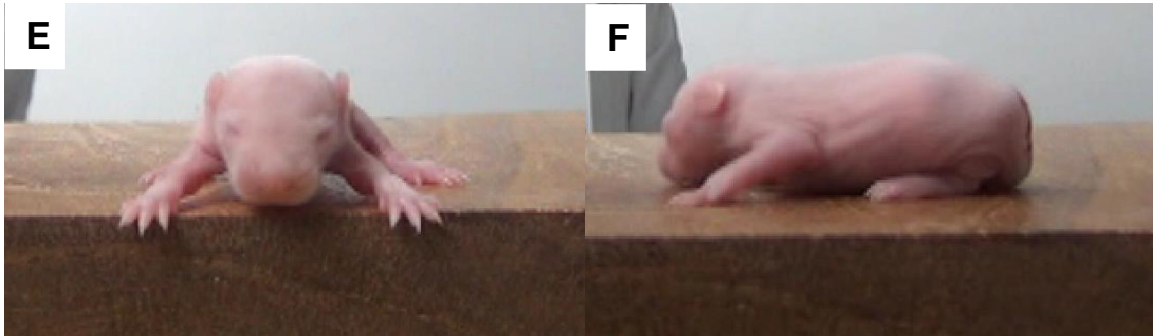


Figura 11. Prueba de evitación de bordes. E) Colocación de la cría con las extremidades superiores y la nariz en el borde de la plataforma, F) Actividad locomotora alejándose del borde.

v. Análisis estadístico.

El análisis de las conductas fue realizado mediante el programa The Observer XT (Noldus Technologies, Países Bajos), realizando evaluaciones de las sesiones experimentales que fueron videograbadas, evaluando la frecuencia, la duración total y media de las conductas evaluadas.

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas t de Student, ANOVA de dos factores y para los datos que no mostraron homogeneidad de las varianzas se realizó la prueba Holm-Sidak y la U de Mann-Whitney y ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis.

El análisis se llevó a cabo a través del programa de cómputo SYSTAT, Sigma Plot v. 11.0 (EUA).

X. Resultados.

Prueba de geotaxia negativa en ratas hembra.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en las ratas de alto y bajo bostezo hembras para la prueba de geotaxia negativa. En la Figura 12, se muestran los resultados obtenidos de la latencia para la realización del reflejo de geotaxia.

En la Figura 12 A, las ratas de bajo bostezo del grupo tratado con BPA tuvieron un mayor tiempo promedio para girar en la prueba de la geotaxia negativa en comparación a los controles (prueba de la U de Mann-Whitney, $U = 36$, $P < 0.014$).

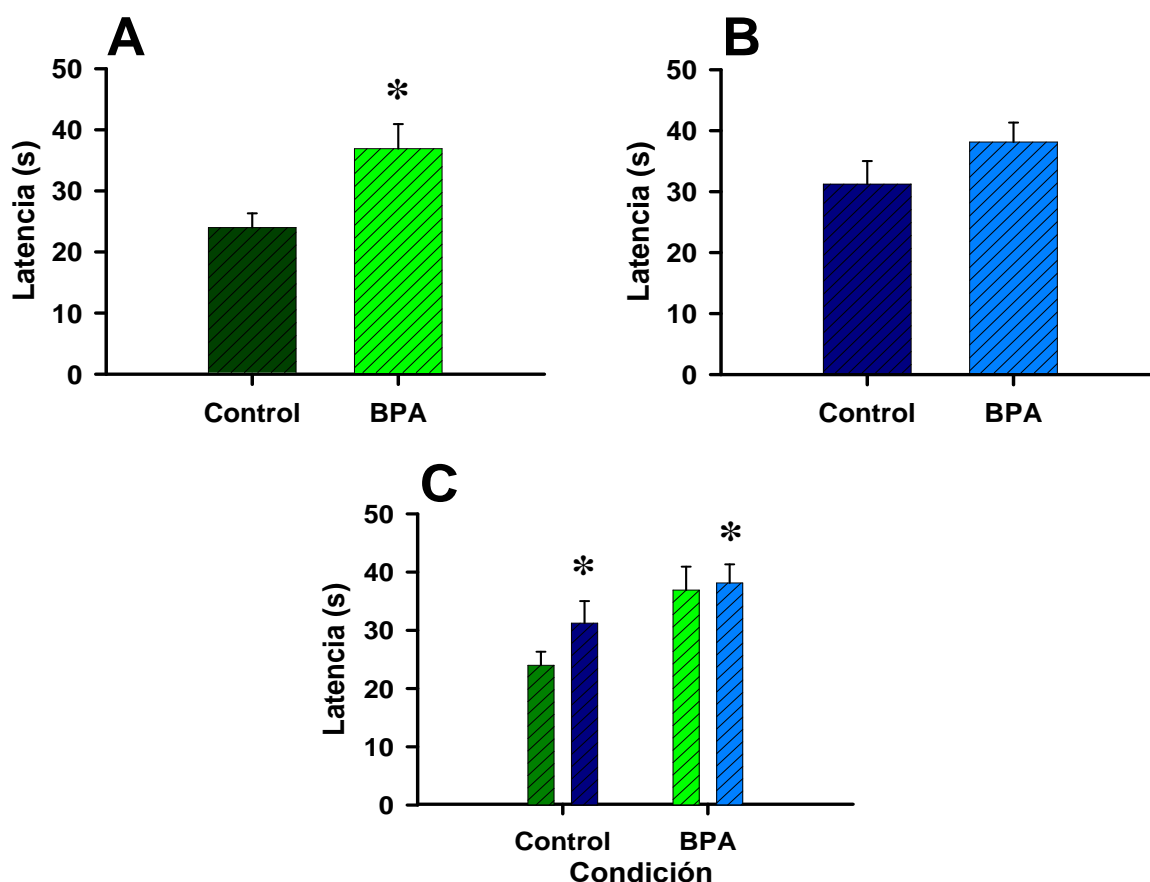


Figura 12. Evaluación de la geotaxia negativa en ratas hembra control y tratadas con Bisfenol A en ambas sublíneas. A) En verde, latencia en la prueba de geotaxia negativa en ratas de bajo bostezo (LY) hembras, U de Mann-Whitney, $U = 36$, $P = 0.014$ **B)** En azul, latencia en la prueba de geotaxia negativa en ratas de alto bostezo (HY) hembras, **C)** Comparación entre los grupos ratas de bajo bostezo (LY) vs alto bostezo (HY), ANOVA de dos factores, $H = 2.96$, $gl = 1$, $P < 0.05$. Datos presentados en media \pm E.E.M.

Por otra parte, en las ratas de alto bostezo no se obtuvo diferencia en el tiempo que transcurre para realizar la prueba en el grupo tratado con BPA en comparación con el grupo control, véase Figura 12, B. En la Figura 12, C, hay una diferencia significativa entre los grupos control y los tratados con Bisfenol A (ANOVA de dos factores, $H = 2.963$, $gl = 1$, $P < 0.05$).

Prueba de geotaxia negativa en ratas macho.

En la Figura 13, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de geotaxia negativa en los diferentes grupos de machos, obteniendo un aumento en el tiempo promedio del grupo tratado con BPA en comparación al grupo control en la prueba de geotaxia para las ratas de bajo bostezo, que no alcanzó significancia estadística.

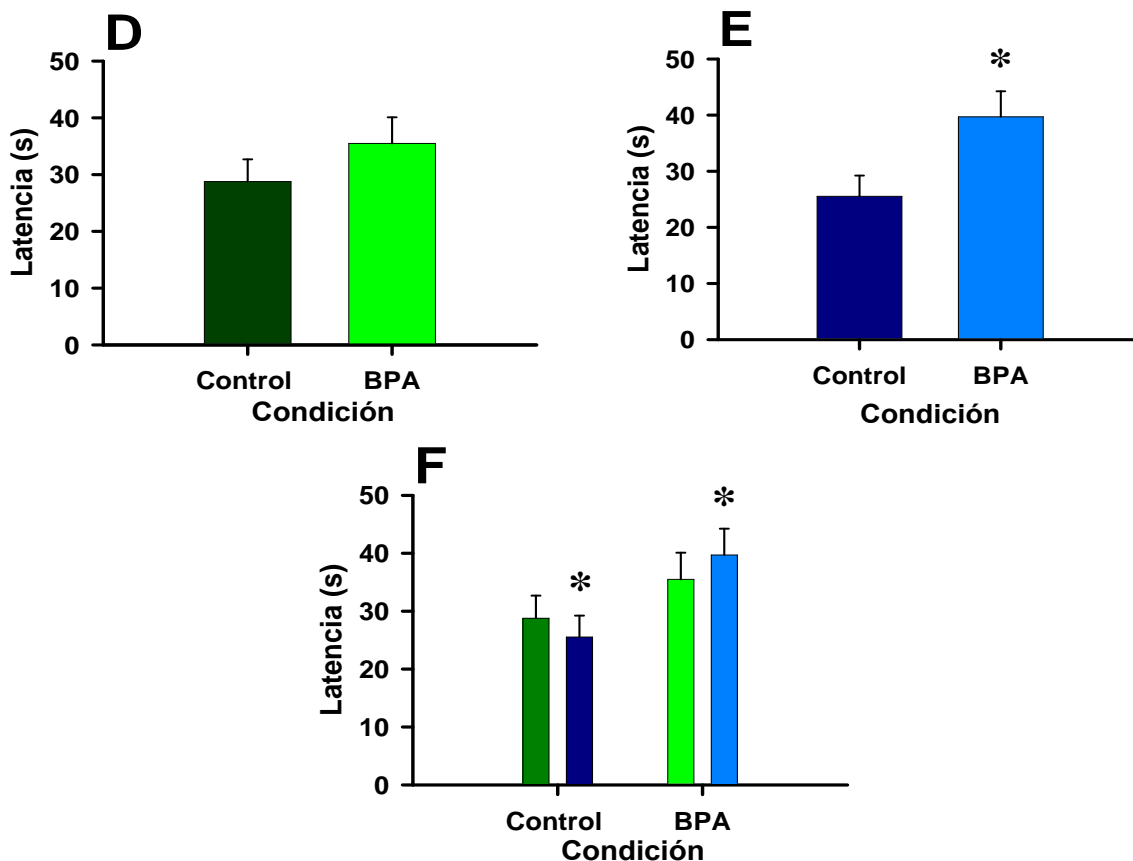


Figura 13. Evaluación de la geotaxia negativa en ratas macho control y tratadas con Bisfenol A de ambas sublíneas, D) En verde, latencia en la prueba de geotaxia negativa en ratas de bajo bostezo macho, **E)** En azul, latencia en la prueba de geotaxia negativa en ratas de alto bostezo macho, U de Mann-Whitney, $U = 70.5$, $P = 0.032$ **F)** Comparación entre los grupos de ratas de bajo bostezo respecto de las de alto bostezo, ANOVA de dos factores, $H = 2.44$, $gl = 1$, $P = 0.018$. Datos presentados en media \pm E.E.M.

En comparación las ratas de alto bostezo macho tratadas con BPA (véase Figura 13, E), muestran un aumento significativo en el tiempo empleado de la prueba de geotaxia negativa en comparación con el grupo control (U de Mann-Whitney, $U = 70.5$. $P = 0.032$).

En la Figura 13, F, observamos que existe una diferencia entre los grupos tratados con BPA y grupos control (ANOVA de dos factores, $H = 2.445$, $P = 0.018$).

Prueba de enderezamiento en ratas hembra.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de enderezamiento, en las ratas de bajo y alto bostezo en hembras.

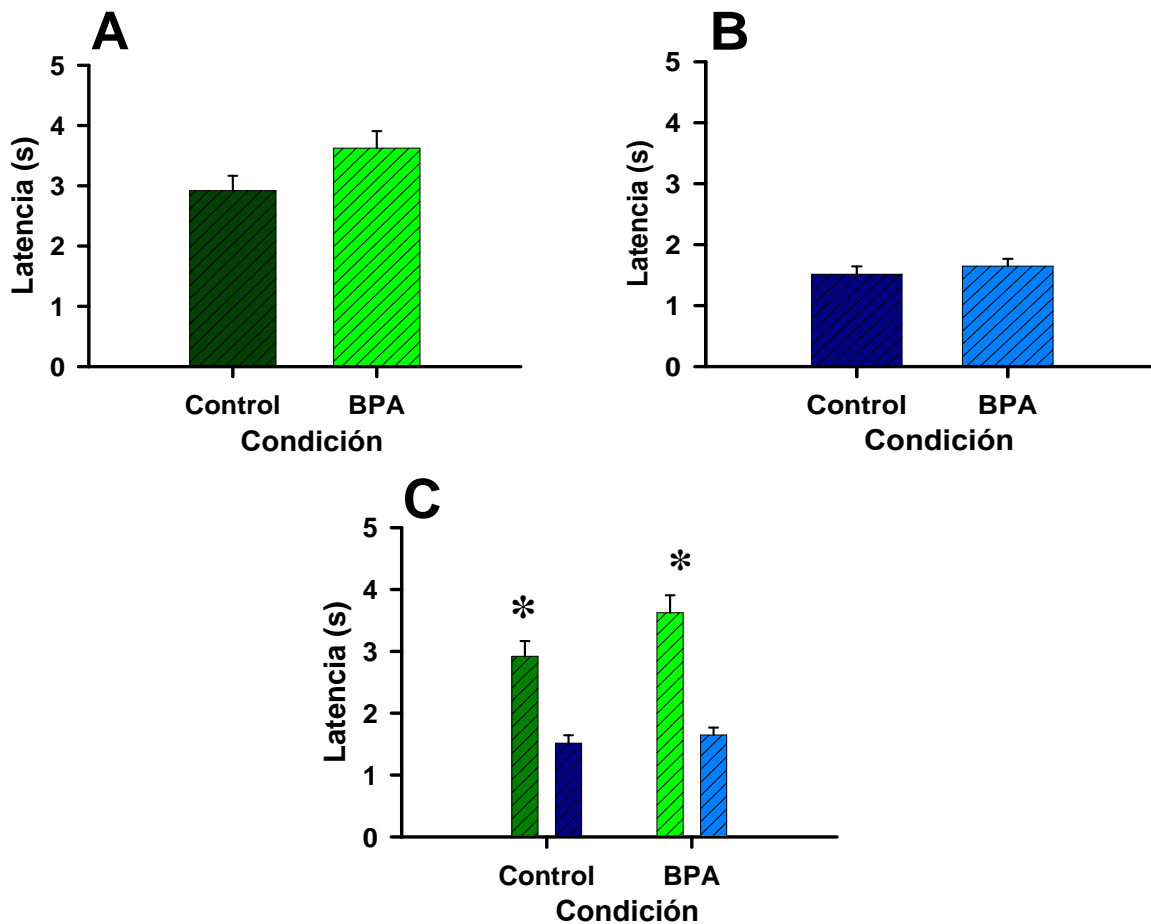


Figura 14. Evaluación del enderezamiento en las crías hembra de rata de alto y bajo bostezo tratadas con Bisfenol A y control. A) En verde, latencia en la prueba de enderezamiento en ratas de bajo bostezo hembra, **B)** En azul, latencia en la prueba de enderezamiento en ratas de alto bostezo hembra, **C)** Comparación de grupos ratas de bajo bostezo vs alto bostezo, ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 8.435$, $gl = 1$, $P < 0.001$; $H = 2.081$, $gl = 1$, $P = 0.043$. Datos presentados en media \pm E.E.M

En la Figura 14, A, se muestra el tiempo promedio para la prueba de enderezamiento, donde se muestra un mayor tiempo en el grupo tratado con BPA respecto al control, aunque no alcanza significancia. En la Figura 14, B, las ratas control y tratadas con BPA mostraron un desempeño similar en ambos grupos experimentales.

En la Figura 14, C, se obtuvo una diferencia significativa entre la comparación de los grupos experimentales de las ratas de bajo bostezo respecto a las de alto bostezo (ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 8.435$, $gl = 1$, $P < 0.001$), y la comparación de los grupos BPA respecto a los controles (ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 2.081$, $gl = 1$, $P = 0.043$).

Prueba de enderezamiento en ratas macho.

Con respecto a los machos evaluados (Véase Figura 15) en la prueba de enderezamiento se obtuvo una diferencia significativa en las ratas de bajo bostezo machos, del grupo control respecto al tratado con BPA (U de Mann-Whitney, $U = 27.5$, $P = 0.002$); (véase Figura 15, D).

El grupo tratado con BPA y el control de las ratas de alto bostezo, en la Figura 15 E, no obtuvieron diferencias significativas, además de tener desempeños similares en ambos grupos.

Los resultados muestran diferencias entre los grupos control de bajo bostezo y alto bostezo (ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 3.771$, $gl = 1$, $P < 0.001$). Por último, también obtuvimos diferencias significativas en el desempeño entre los grupos tratamiento con BPA de las ratas de bajo bostezo respecto de las de alto bostezo (ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 7.973$, $gl = 1$, $P < 0.001$), véase Figura 15, F.

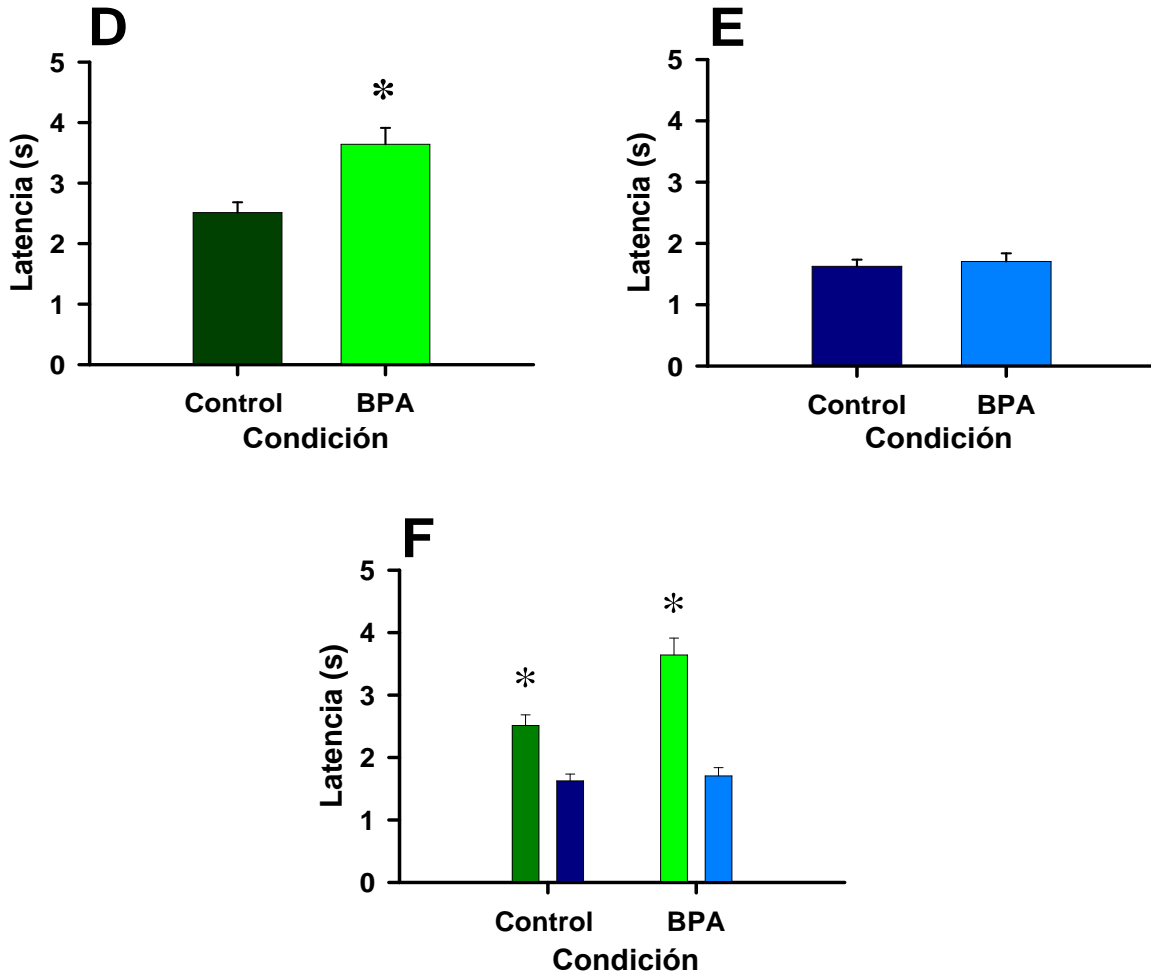


Figura 15. Evaluación en la prueba de enderezamiento en las crías macho de rata de alto y bajo bostezo tratadas con Bisfenol A y control. D) En verde, latencia en la prueba de enderezamiento en ratas de bajo bostezo macho, U de Mann-Whitney, $U = 27.5$, $P = 0.002$ **E)** En azul, latencia en la prueba de enderezamiento en ratas de alto bostezo macho, **F)** Comparación de grupos ratas de bajo bostezo vs alto bostezo en la prueba de enderezamiento, ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 3.771$, $gl = 1$, $P < 0.001$; $H = 7.973$, $gl = 1$, $P < 0.001$. Datos presentados en media \pm E.E.M

Prueba de evitación de bordes en ratas hembra.

La evaluación de la prueba de evitación de bordes no se obtuvieron resultados significativos tanto en los grupos pertenecientes a las ratas de bajo como en los de alto bostezo en las hembras.

La comparación entre grupos, se obtuvo una diferencia significativa entre ambas sublíneas de las ratas de bajo bostezo y de alto bostezo (ANOVA de Kruskal Wallis, $H = 2.872$, $gl = 8$, $P < 0.006$).

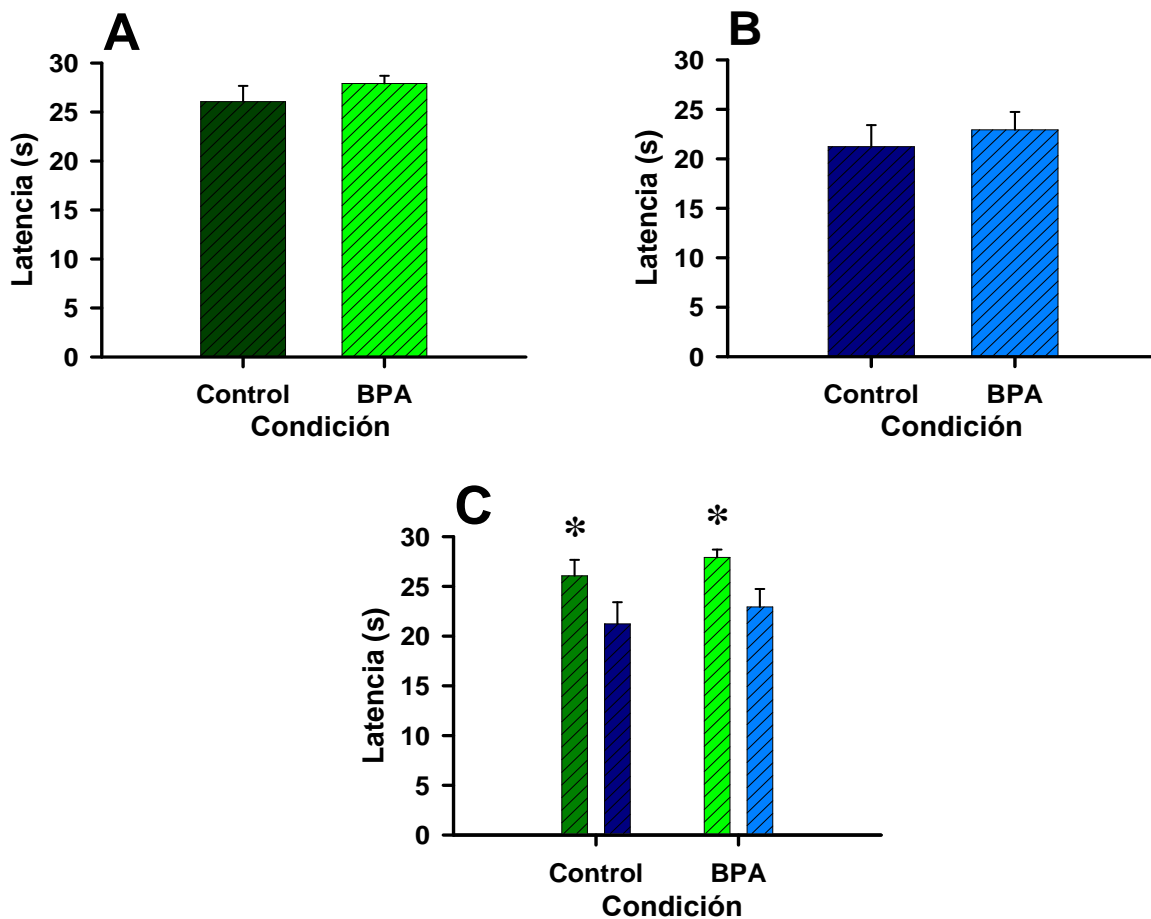


Figura 16. Determinación del tiempo para evitar el borde en ratas hembra de alto y bajo bostezo tratadas con Bisfenol A y control. A) En verde, latencia en la prueba de evitación de bordes en las ratas de bajo bostezo hembra, **B)** En azul, latencia en la prueba de evitación de bordes en las ratas de alto bostezo hembra, **C)** Comparación de grupos ratas de bajo bostezo respecto a los de alto bostezo en la prueba de evitación de bordes, ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 2.872$, $gl = 1$, $P < 0.006$. Datos presentados en media \pm E.E.M.

Prueba de evitación de bordes en ratas macho.

Los resultados obtenidos en la prueba de evitación de bordes en ratas macho en la Figura 17 fueron similares a los obtenidos en las hembras. No se obtuvieron diferencias significativas tanto en las ratas de bajo bostezo, (véase Figura 17, D); como en las ratas de alto bostezo, (véase Figura 17, E).

En la Figura 17, F, se obtuvo una diferencia significativa entre los grupos de las ratas de bajo respecto de las de alto bostezo (ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 4.125$, $gl = 1$, $P < 0.001$).

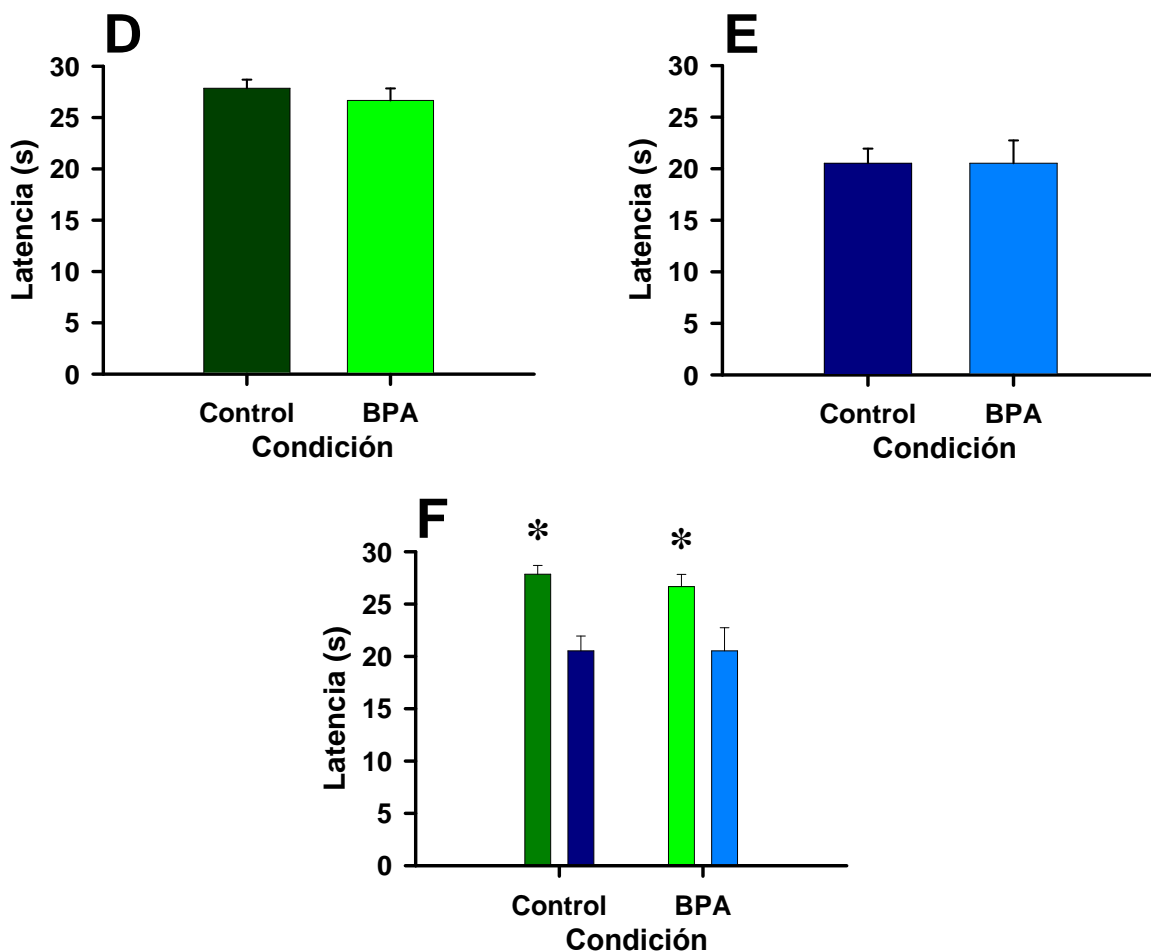


Figura 17. Determinación del tiempo para evitar el borde en ratas macho de alto y bajo bostezo tratadas con BPA y control. D) En verde, latencia en la prueba de evitación de bordes en ratas de bajo bostezo macho, **E)** En azul, latencia en la prueba de evitación de bordes en ratas de alto bostezo macho, **F)** Comparación de grupos ratas de bajo bostezo respecto de los de alto bostezo en la prueba de evitación de bordes, ANOVA de Kruskal-Wallis, $H = 4.125$, $gl = 1$, $P < 0.001$. Datos presentados en media \pm E.E.M.

Evaluación del acarreo de las crías de las ratas de bajo bostezo.

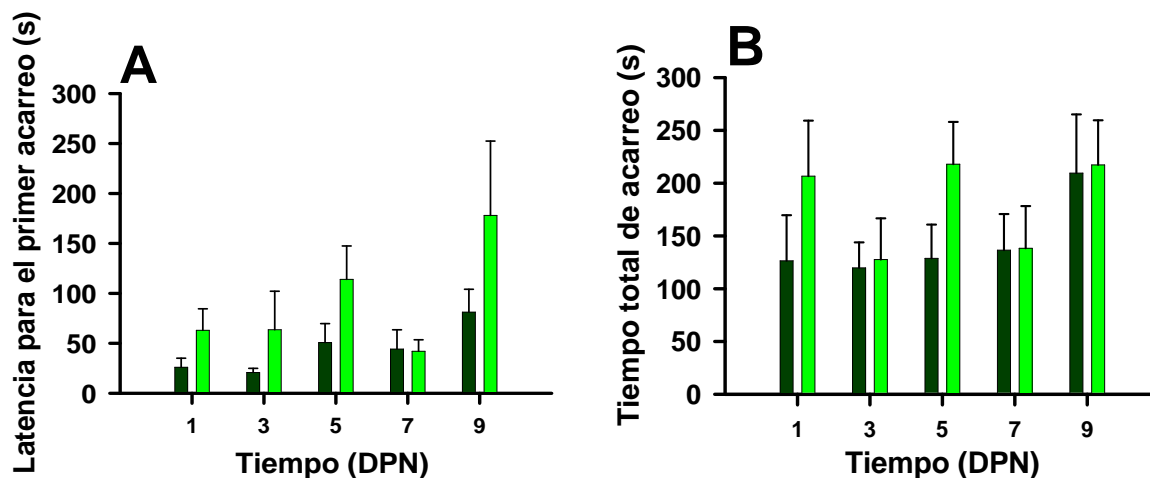


Figura 18. Determinación del acarreo en madres de bajo bostezo expuestas a Bisfenol A y controles. A) El tiempo en segundos de la latencia del primer acarreo en ratas de bajo bostezo, B) El tiempo total en segundos para un acarreo total de las crías en ratas de bajo bostezo. Las madres se evaluaron a los días 1, 3, 5, 7 y 9 postnatales. Datos presentados en media \pm E.E.M.

Los resultados correspondientes a la latencia del primer acarreo en las ratas de bajo bostezo muestran una tendencia al aumento en el tiempo para el acarreo en el grupo tratado con BPA, en comparación al grupo control en el día postnatal 9, sin alcanzar significancia (véase Figura 18, A).

Evaluación del acarreo de las crías de las ratas de alto bostezo.

En la Figura 19, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de acarreo para las ratas de alto bostezo, obteniéndose que tanto en la latencia para el primer acarreo, como en el tiempo total de acarreo son similares en el grupo tratado con BPA y el grupo control, (véase Figura 19, C y D).

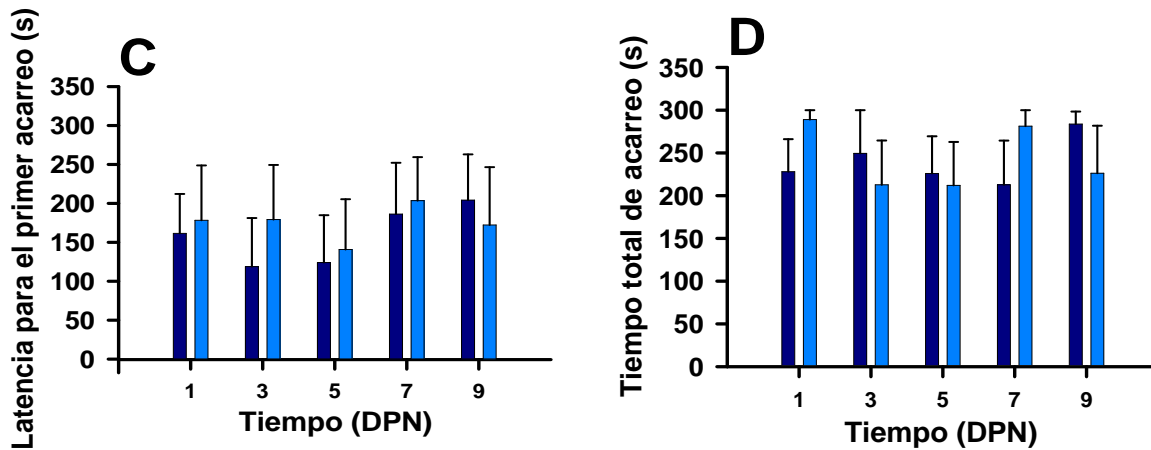


Figura 19. Determinación del acarreo en madres de alto bostezo expuestas a Bisfenol A y controles. C) El tiempo en segundos de la latencia del primer acarreo en ratas de alto bostezo, D) El tiempo total en segundos para un acarreo total de las crías en ratas de alto bostezo. Las madres se evaluaron a los días 1, 3, 5, 7 y 9 postnatales. Datos presentados en media \pm E.E.M.

Evaluación del tiempo de lamido corporal.

Las ratas tratadas con BPA mostraron una disminución en el tiempo de lamido corporal en las ratas de bajo bostezo en los días postnatales 1 y 3, (véase Figura 20, A). En cambio, en las ratas de alto bostezo se obtuvo una disminución significativa en los tiempos de lamido corporal en las ratas tratadas con BPA durante los días postnatales 5, 7 y 9 (t de Student, $t = 2.169$, $gl = 18$, $P < 0.044$).

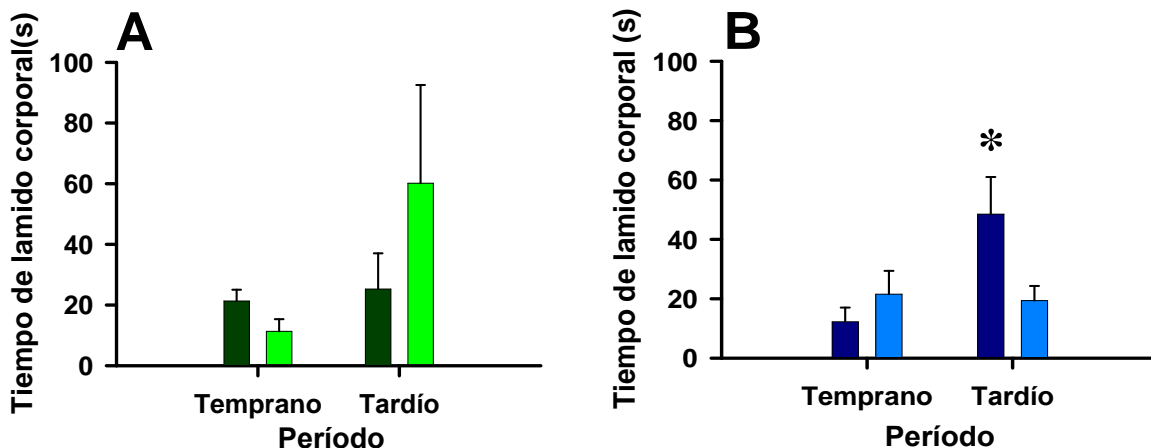


Figura 20. Determinación del tiempo de lamido corporal en ratas de alto y bajo bostezo. A) En verde, el tiempo promedio de los lamidos corporales en ratas de bajo bostezo, B) En azul, el tiempo promedio en segundos de los lamidos corporales en ratas de alto bostezo, t de Student, $t = 2.169$, $gl = 18$, $P < 0.044$. Los datos se presentan en periodos de 1 + 3 y 5 + 7 + 9, días postnatales. Datos presentados en media \pm E.E.M.

Evaluación del tiempo de lamido genital.

Con respecto al tiempo empleado por la madre de lamido genital (Véase Figura 21, C y D), tanto en las ratas de bajo bostezo como en las ratas de alto bostezo no se obtuvieron diferencias significativas al comparar los grupos tratados con BPA respecto de los grupos control.

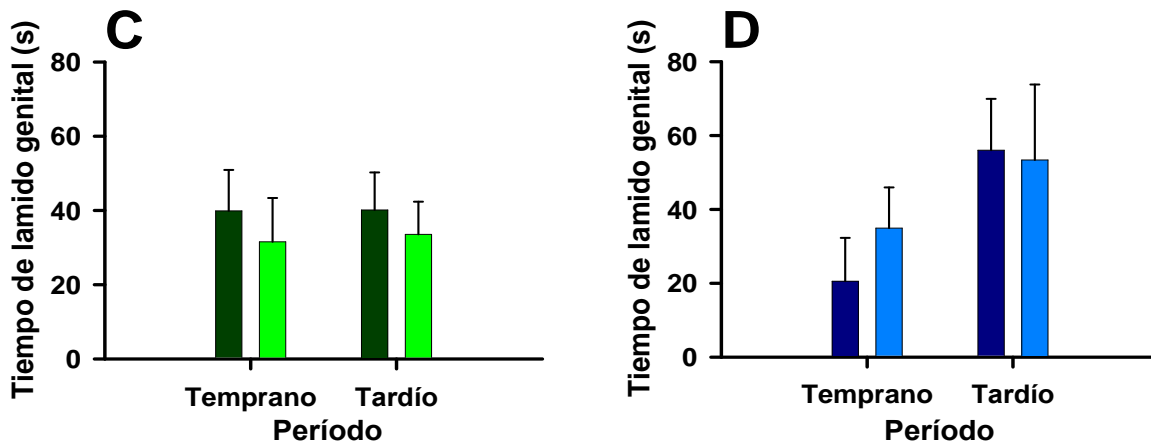


Figura 21. Determinación del tiempo de lamido genital en ratas de alto y bajo bostezo. C) En verde, el tiempo promedio en segundos de los lamidos genital en ratas de bajo bostezo, **D)** En azul, el tiempo promedio en segundos de los lamidos genital en ratas de alto bostezo. Los datos se presentan en periodos de 1 + 3 y 5 + 7 + 9, días postnatales. Datos presentados en media \pm E.E.M.

Evaluación de tiempo de amamantamiento de alta y baja intensidad

De los resultados obtenidos en la comparación de los tiempos de amamantamiento obtuvimos una amplia variabilidad en los tiempos que las madres despliegan esta conducta, tanto en los grupos control como los tratados con BPA, así como en las ratas de alto y las de bajo bostezo.

En ninguno de los resultados presentados en la Figura 22 se obtuvieron diferencias significativas.

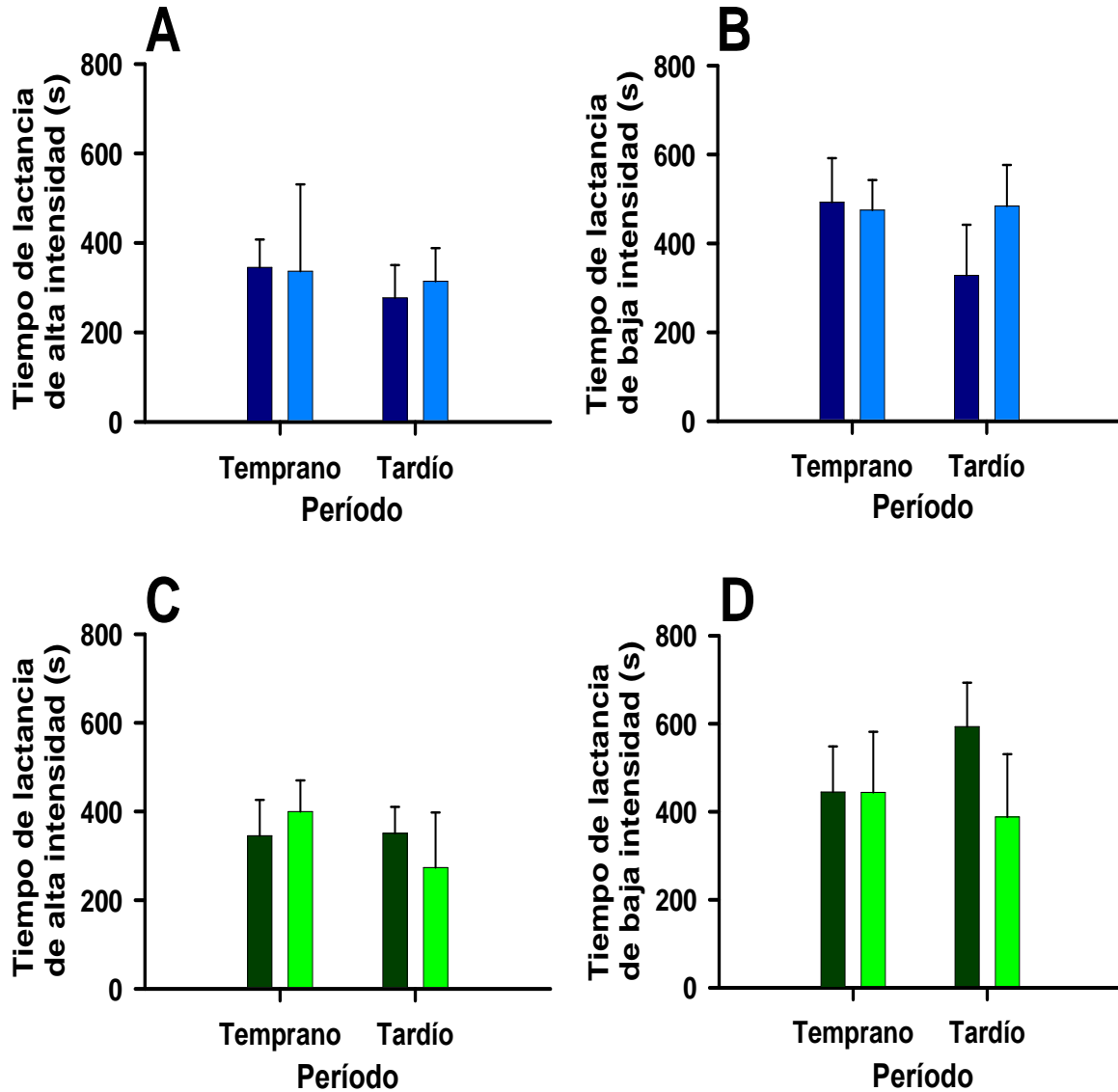


Figura 22. Determinación de los tiempos de amamantamiento de alta intensidad y baja intensidad en ratas de alto y bajo bostezo. A) El tiempo de amamantamiento de alta intensidad en ratas de alto bostezo, B) El tiempo de amamantamiento de baja intensidad en ratas de alto bostezo, C) El tiempo de amamantamiento de alta intensidad en ratas de bajo bostezo, D) Tiempo de amamantamiento de baja intensidad en ratas de bajo bostezo. Los datos se presentan en periodos de 1 + 3 y 5 + 7 +9, días postnatales. Datos presentados en media \pm E.E.M.

XI. Discusión.

Los resultados de la evaluación de la conducta materna en las ratas de alto y bajo bostezo tratadas con BPA mostró una alteración en la latencia al primer acarreo y en el tiempo total de acarreo en las ratas de bajo bostezo, en comparación con las ratas control de esta sublínea, aunque no alcanzó la significancia estadística.

Sin embargo, se muestra que se presentó una disminución de la motivación para realizar el acarreo en los días 5 y 9 DPN en las ratas de bajo bostezo (véase Figura 18). Por otra parte, en las ratas de alto bostezo existe la motivación para realizar el acarreo, aunque es menor en comparación a las ratas de bajo bostezo, lo que produce una mayor latencia para el primer acarreo y para el acarreo total de las crías en las ratas tratadas con BPA como en los controles, respecto a las ratas de bajo bostezo (véase Figura 18 y Figura 19).

Este cambio en el tiempo para realizar el primer acarreo puede deberse a las posibles alteraciones en el sistema dopaminérgico en las ratas de alto bostezo, el cual participa en el inicio de las conductas maternas de acuerdo con los estudios de Byrnes y cols., 2002, ya que las lesiones en el núcleo accumbens retrasan las respuestas en los cuidados maternos. Cabe destacar que dicho núcleo tiene un rol relevante en el sistema dopaminérgico, donde además se ha reportado que la administración de drogas antagonistas para la familia de receptores D1 y D2 alteran el despliegue de la conducta materna (Giordano y cols., 1990), dado que la administración del BPA durante la gestación y la lactancia es un periodo de alta susceptibilidad del núcleo accumbens y su consecuente alteración de la señalización dopaminérgica.

La sublínea HY y LY ofrecen un par de ventajas ya que su despliegue maternal difiere de lo mostrado por la cepa Sprague-Dawley (Ugarte y cols., 2011). Adicionalmente las ratas HY son más sensibles a la acción inductora de bostezo de los fármacos de la familia D2 como la apomorfina, el (-)-3 PPP o el (-) quinpirole (Urbá – Holmgren y cols., 1990; Eguibar y cols., 2003), así como de los agonistas D1 sobre el aseo (Eguibar y cols., 2003). Estos resultados aportan evidencia de que las sublíneas HY y LY resultan ideales para valorar los efectos del BPA.

Se ha reportado que en ratas gestantes el BPA tiene un mayor efecto disruptor, debido a que se disminuye la capacidad de metabolizar por el hígado, en comparación a las ratas no gestantes; aunado a esto se ha reportado que el BPA posee la capacidad de ser transferido a la placenta, lo que altera la morfología y la expresión de diversas proteínas en el hígado de roedores (Mileva y cols., 2014; Strakovsky y cols., 2018).

La administración de BPA produjo un cambio en los tiempos de lamido corporal y genital en ambas sublíneas, siendo en las etapas tardías de la lactancia las que presentaron el incremento en el lamido corporal por parte de las ratas de bajo bostezo en el grupo tratado con BPA, y una disminución en el grupo tratado en las ratas de alto bostezo (véase Figura 20). De hecho, Masís-Calvo y cols., han reportado que variaciones en los tiempos de lamido corporal y genital, durante la lactancia en ratas Sprague-Dawley genera diferentes respuestas en las crías cuando se les exponen a ambientes novedosos como son el laberinto en cruz elevado o el campo abierto, donde las crías que recibieron mayores tiempos de lamido muestran conductas de mayor exploración y movilidad, algo que en el caso de las ratas de bajo y alto bostezo se relaciona con la expresión de respuesta ante estresores.

Lapp y cols., 2022, así como Seta y cols., en 2005, mostraron que en ratas Sprague-Dawley expuestas al BPA durante la gestación y la lactancia, disminuyeron los tiempos de lamido corporal y del lamido anogenital, además de mostrar alteraciones en los genes relacionados al lamido corporal y genital en el hipocampo (Lapp y cols., 2022; Seta y cols., 2005). Estos resultados son similares a los resultados obtenidos en las ratas de bajo bostezo y de alto bostezo, siendo las primeras las que expresaron mayormente cambios en su despliegue materno. Las ratas de bajo bostezo tienen un despliegue menos eficiente de la conducta materna cuando se compara con las ratas Sprague-Dawley, mientras que las ratas de alto bostezo tienen un desempeño pobre en la calidad de sus despliegues de la conducta materna en comparación a las ratas de bajo bostezo, según lo reportado por Ugarte y cols., 2006 y Ugarte y cols., 2011. Dichas variaciones pueden

deberse a alteraciones en el APM, un área involucrada en la regulación positiva de la conducta materna (Seta y cols., 2005; Yu y cols., 2020; Kohl y cols., 2016).

Se han reportado diferencias menores en los tiempos de amamantamiento de baja y alta intensidad, en ambas sublíneas, aunque se obtuvieron mayores tiempos de amamantamiento por parte de las ratas de bajo bostezo, correspondiendo a lo reportado por Ugarte y cols., en 2006 y Ugarte y cols., 2011, siendo las madres pertenecientes a la sublínea de bajo bostezo más competentes en comparación con la sublínea de alto bostezo.

Los resultados obtenidos entre las sublíneas de bajo y de alto bostezo tratadas con BPA y los controles, puede deberse a la diferente capacidad fenotípica de respuesta al estrés, lo que es evidente incluso entre los grupos control de ambas sublíneas. Se ha reportado en ratas que la exposición a estresores durante la gestación afecta la capacidad de respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), lo que altera el desarrollo de las crías a corto y largo plazo, debido a que dicho eje tiene una hipoactividad durante la gestación, lo que favorece el correcto cuidado de las crías, aunque limita la capacidad de respuesta ante los estresores externos, lo que se ha asociado al estrés gestacional en las primeras etapas del desarrollo con el despliegue de conductas ansiosas y depresivas en ratas adultas cuyas madres sufrieron estrés durante la gestación (Mileva y cols., 2014; Boero y cols., 2018).

Otra alteración de la conducta materna en las ratas tratadas con BPA se puede derivar a su vez de las alteraciones en la actividad de los receptores a estrógenos α por acción del BPA y su afinidad a este tipo de receptores, ya que posee una actividad agonista de baja intensidad. El receptor a estrógenos α por otra parte regula la expresión a los receptores a progesterona en el núcleo preóptico medio, alterando la señalización para el inicio y mantenimiento de la conducta materna (Fahrenkopt y cols., 2020).

Adicionalmente, se ha reportado que los disruptores endocrinos, como son los bisfenoles y sus derivados, modifican los marcadores de metilación en humanos y roedores, que pueden afectar a largo plazo y durante varias generaciones algunas conductas. Por otra parte, generando lesiones prostáticas precancerosas en ratas adultas y alteraciones epigenéticas en la región frontal cerebral de ratón, se mostró que puede alterar al área preóptica media que es vital para el despliegue de la conducta materna (Mileva y cols., 2014).

Aunado a las alteraciones en los cuidados maternos, Altamirano y cols., 2015 mostraron que la exposición a BPA retrasa y altera el desarrollo de las glándulas mamarias en las ratas, con alteraciones en el contenido lipídico de la leche materna lo que genera a su vez cambios nutricionales en las crías, relacionándose con mayores ganancias de la masa corporal.

Dado que el BPA está definido como un disruptor endocrino que altera diversas vías metabólicas vitales para el desarrollo, Wang y cols., 2013 y Gibert y cols., 2011, mostraron que la administración de BPA produjo un aumento en la apoptosis celular en la musculatura esquelética, además de alteraciones en los órganos otolíticos del pez cebra, por lo que se requiere un análisis en modelos mamíferos como son las ratas, ya que la administración de BPA produjo un aumento en los tiempos de respuesta para el reflejo de enderezamiento y de la geotaxia negativa en ambas sublíneas, siendo este aumento debido a las alteraciones vestibulares y/o musculo-esqueléticas (Gilbert y cols., 2011; Wang y cols., 2013).

En la prueba de geotaxia negativa las ratas hembra de bajo bostezo fueron las que obtuvieron las diferencias significativas, respecto a las ratas macho de alto bostezo, diferencias que pueden derivar por efectos sexo-dependientes de la administración del BPA, ya que este químico altera vías de señalización en los ovarios y los testículos de diferentes maneras (Murata y cols., 2018).

Para la prueba de evitación de bordes se obtuvieron diferencias significativas entre ambas sublíneas, con un mayor tiempo para desplazarse hacia atrás y evitar los bordes por parte de las ratas de bajo bostezo tanto, hembras como machos, lo que se puede deber a posibles alteraciones vestibulares y/o musculoesqueléticas, que alteran la percepción de las crías lo que puede modificar la respuesta para evitar bordes.

Prasse y cols., en un estudio reciente en 2022 mostraron que la administración de BPA altera la estructura ósea en ratas, ya que en hembras se mostró una elevación del hueso trabecular y en el área medular; por otra parte, Wang y cols., 2021 administraron 10 µg/Kg/día de BPA en ratas gestantes lo que provocó alteraciones en el desarrollo óseo, con disminución de la masa ósea y un retraso en el desarrollo en ratas hembra. Es notable que el BPA afecta el desarrollo de los mamíferos cuando se expone a este químico en etapas tempranas del desarrollo.

Los resultados muestran que además de existir una diferencia entre los grupos tratados con BPA y los grupos control de las sublíneas de bajo y alto bostezo. También existen diferencias en el desempeño mostrado entre ambas sublíneas, siendo las ratas de alto bostezo las que tuvieron menores tiempos de respuesta en la prueba de enderezamiento, lo que puede atribuirse a las diferencias en los cuidados recibidos durante el desarrollo.

En seres humanos se ha mostrado una relación de concentraciones urinarias de BPA en madres, con alteraciones en niños de 2 años en su neurodesarrollo motor y cognitivo en diversas poblaciones en China, lo que coincide a lo mostrado en modelos animales (Wang y cols., 2023).

Por otra parte, en un estudio realizado en monos por Negishi y cols., 2014, se mostraron alteraciones cognitivas en monos de 2 años, con una mayor ganancia de peso y despliegues conductuales femeninos en los machos. Por lo tanto, las alteraciones que se presentan en las etapas tempranas del desarrollo ante la exposición al BPA repercuten en etapas juveniles y adultas, lo que merma el desempeño de los seres vivos.

Las alteraciones en la calidad o privación de la conducta materna producen déficits en el desarrollo cognitivo, social y en la respuesta al estrés en humanos y en diversos modelos animales como la rata, ya que la posición de cifosis de alta intensidad y aseo anogenital son las principales variables que modifican los niveles de respuesta de ansiedad y depresión en la edad adulta (Champagne y cols., 2003).

Resultados y discusión.



Madres HY	Crías HY	Madres LY	Crías LY
<ol style="list-style-type: none"> 1. Reducción en la motivación para el primer acarreo en comparación con las ratas LY, debido probablemente a alteraciones en el sistema dopaminérgico y en el núcleo accumbens. 2. Disminución en el tiempo de lamido corporal en el grupo tratado con BPA, debido a posiblemente por alteraciones en los receptores para estrógenos tras la administración de BPA. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. En las crías macho tratadas con BPA se obtuvo un mayor tiempo para realizar la prueba de geotaxia negativa; y las ratas macho y hembras tratadas con BPA tuvieron un menor tiempo en la prueba de enderezamiento en comparación con las ratas LY. 2. En la prueba de evitación de bordes hubo una disminución significativa al comparar las ratas HY con las LY. 3. Las diferencias obtenidas en las pruebas pueden derivar de alteraciones vestibulares y/o musculoesqueléticas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Alteración en la latencia de primer acarreo en los días 5 y 9 PND posiblemente debido a la alteración de las vías endocrinas tras la administración de BPA. 2. Aumento en el tiempo de lamido corporal posiblemente debido a una alteración en los receptores para estrógeno tras la administración de BPA. 3. El BPA altera con mayor severidad los tiempos de amamantamiento tardío y el lamido genital en comparación con las ratas HY, afectando el área preóptica medial. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. En las crías hembra tratadas con BPA se obtuvo un mayor tiempo para realizar la prueba de geotaxia negativa. En las crías macho tratadas con BPA las cuales emplearon más tiempo en la prueba de enderezamiento respecto de los grupos control. 2. En la prueba de evitación de bordes hubo una disminución significativa en las ratas HY con respecto a las LY, tanto en hembras como en machos. 3. Las diferencias obtenidas en las pruebas pueden derivar de alteraciones vestibulares y/o musculoesqueléticas.

Figura 23. Resultados de mayor relevancia. Se presentan los resultados obtenidos en las ratas de alto y bajo bostezo al evaluar la conducta materna y el neurodesarrollo de las crías. DPN, día postnatal, BPA, bisfenol A, LY, bajo bostezo, HY, alto bostezo.

XII. Conclusiones.

1. Las ratas de bajo bostezo tienen una mayor calidad de despliegue de su conducta materna con respecto a lo obtenido a las ratas de alto bostezo.
2. El BPA altera con mayor severidad la conducta materna, en los tiempos de amamantamiento tardío y el lamido genital en las ratas de bajo bostezo en comparación a las ratas de alto bostezo, afectando el área preóptica medial
3. Las ratas de alto bostezo presentan una menor motivación para iniciar el primer acarreo de las crías posiblemente debido a alteraciones del sistema dopaminérgico y/o del núcleo accumbens.
4. La exposición al BPA altera la respuesta de las crías a las pruebas de geotaxia negativa y de enderezamiento en ambas sublíneas.

XIII. Referencias.

Ahsan, N., Ullah, H., Ullah, W., Jahan, S. (2018). Comparative effects of Bisphenol S and Bisphenol A on the development of female reproductive system in rats; a neonatal exposure study. *Chemosphere*. **197**: 336-343.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.118>

Altamirano, G. A., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., Gómez, A. L., Delconte, M. B., Kass, L. (2015). Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **411**: 258-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.007>

Arck, P., Hansen, J., P., Jericevic, M., B., Piccinni, M.P., Szekeres-Bartho, J. (2007). Progesterone during pregnancy: Endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *American Journal of Reproductive Immunology*. **58**: 268-279. doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00512.x

Beery, A.K., Francis, D.D. (2011). Adaptive significance of natural variations in maternal care in rats: A translational perspective. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. **35**: 1552-1561. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.03.012

Boero, G., Biggio, F., Pisu, G., M., Locci, V., Porcu, P., Serra, M. (2018). Combined effects of gestational stress and postpartum stress on maternal care in rats. *Physiology and Behavior*. **184**: 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.11.027>.

Bridges, S. R. (2015). Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*. (36) 178-196. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.007>

Byrnes, M., E., Rigerio, A., B., Bridges, S., R. (2002). Dopamine antagonist during parturition disrupt maternal care and the retention of maternal behavior in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **73**: 869-875. DOI: 10.1016/S0091-3057(02)00941-3

Champagne, A., F., Francis, D., D., Mar, A., Meaney, J., M. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for effects of environmental on development. *Physiology and Behavior*. **79**: 359-371. doi:10.1016/S0031-9384(03)00149-5

Clarac, F. Vinay, L., Cazalets, J.R., Fady, J.C., Jamon, M. (1998). Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain research reviews*. **28**: 35-43. DOI: [10.1016/S0165-0173\(98\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(98)00024-1)

Eguibar, J. R., Romero-Carbente, J., C., Moyaho, A. (2003). Behavioural differences between selectively bred rats: D₁ and D₂ receptors in yawning and grooming. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **74**: 827-832. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)01082-1](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)01082-1)

Elsworth, J., D., Jentsch, J., D., Groman, S., M, Roth, R., H., Redmond Jr., D. E., Leranth, C. (2015). Low circulating levels of bisphenol-A induce cognitive deficits and loss of asymmetric spine synapses in dorsolateral prefrontal cortex and hippocampus of adult male monkeys. *Journal of Comparative Neurology*. **25**: 1248-1257. <https://doi.org/10.1002/cne.23735>

Fahrenkopt, A., Wagner, K., C. (2020). Bisphenol A (BPA) induces progesterone receptor expression in an estrogen receptor α -dependent manner in perinatal brain. *Neurotoxicology and Teratology*. **78**: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2020.106864>

Feather-Schussler, D., N., Ferguson, T., S. (2016). A battery of motor test in a neonatal mouse model of cerebral palsy. *Journal of Visualized Experiments*. **117**: 1-12. DOI: doi:10.3791/53569

Ferreira, A., Agrati, D., Uriarte, N., Pereira, M., Zuluaga, M., J. (2012). The rat as a model for studying maternal behavior. *Behavioral Animal Models*. 73-88.

Giordano, A., L., Johnson, A. E., Rosenblatt, J. S. (1990). Haloperidol-induced disruption of retrieval behavior and reversal with apomorphine in lactating rats. *Physiology and Behavior*. **48**: 211-214. DOI: [10.1016/0031-9384\(90\)90288-f](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90288-f)

Gilbert, y., Messai-Sassi, S., Fini, J.B., Bernard, L., Zalko, D., Cravedi, J.P., Balaguer, P., Andersson-Lendahl, M., Demeneix, B., Laudet, V. (2011). Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis. *BMC Developmental Biology*. **11**: 1-17. <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/11/4>

Gómez, C., Saldívar, G, A., Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Mental*. **25**:14-24

Gross, R., S., Brown, N., M., Mendelsohn, A., L., Katzow, M., W., Arana, M., M., Messito, M., J. (2021). Maternal Stress and Infant Feeding in Hispanic Families Experiencing Poverty. *Academic Pediatric Association*. **0**: 1-9. DOI: [10.1016/j.acap.2021.04.022](https://doi.org/10.1016/j.acap.2021.04.022)

Kim, M., J., Park, Y., J. (2019). Bisphenols and Thyroid Hormone. *Endocrinology and Metabolism*. **4**: 340-348. <https://doi.org/10.3803/EnM.2019.34.4.340>

Kohl, J., Autry, A., E., Dulac, C. (2016). The neurobiology of parenting: A neural circuit perspective. *Bioessays*. **39**: 1-11. DOI 10.1002/bies.201600159

Lapp, H.E., Margolis, A.E., Champagne, F.A. (2022). Impact of a bisphenol A, F, S mixture and maternal care on the brain transcriptome of rat dams and pups. *Neurotoxicology*. **93**: 22-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.08.014>

Lee, S., M., Jeon, S., Jeong, H., J., Kim, B.N., Kim, Y. (2020). Dibutyl phthalate exposure during gestation and lactation in C57BL/6 mice: Maternal behavior and neurodevelopment in pups. *Environmental Research*. **182**. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.109025>.

Mandel, D, N., Loira-Gamboa, B., Cebrián, E, M., Ortega, M, A., Carrillo, L, L. (2019). Challenges to regulate products containing bisphenol A: Implications for policy. *Salud pública de México*. **5**: 692-697. <https://doi.org/10.21149/10411>

Masís-Calvo, M., Sequeira, C., A., Mora G., A., Fornaguera, T. J. (2013). Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. *Physiology and Behavior*. **118**: 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.033>

Melo, A.I., Caba, M., Castelán, F., Martínez-Gómez, M. (2023). Basic Protocols to Study Parental Behavior in Rats. In: Paredes, R.G., Portillo, W., Bedos, M. (eds) *Animal Models of Reproductive Behavior*. Neuromethods, vol 200. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3234-5_4

Mileva, G., Baker, L., S., Konkle, T.M., A., Bielajew, C. (2014). Bisphenol A: Epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **11**: 7537-7561. doi:10.3390/ijerph110707537.

Moyaho, A., Eguibar, J.R., Díaz, L. (1995). Induced grooming transitions and open field behaviour differ in high- and low- yawning sublines of Sprague-Dowley rats. *Animal Behaviour*. **50**: 61-72. <https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0221>

Murata, M., Kang, J-H. (2018). Bisphenol A and cell signaling pathways. *Biotechnology Advances*. **36**: 311-327. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.002>

Mustieles, V., D'Cruz, S., C., Couderq, S., Rodríguez-Carrillo, A., Fini, J.B., Hofer, T., Steffensen, I.L., Dirven, H., Barouki, R., Olea, N., Fernández, M., F., David, A. (2020). Bisphenol A and its analogues: A comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring. *Environmental International*. **144**: 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105811>

Negishi, T., Kakagami, A., Kawasaki, K., Nishida, Y., Ihara, T., Kuroda, Y., Tashiro, T., Koyama, T., Yoshikawa, Y. (2014). Altered social interactions in male juvenile cynomolgus monkeys prenatally exposed to bisphenol A. *Neurotoxicology and Teratology*. **44**: 46-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2014.05.004>

Nguyen, A., T., Armstrong, E., A., Yager, J., Y. (2017). Neurodevelopmental reflex testing in neonatal rat pups. *Journal of Visualized Experiments*. **122**: 1-10. DOI: doi:10.3791/55261

Prasse, T., Stratos, I., Niehoff, A., Christ, H., Heck, V., Mayer, C., Mittlmeier, T. (2022). Bisphenol A-Related effects on bone morphology and biomechanical properties in an animal model. *Toxics*. **10**: 1-13. <https://doi.org/10.3390/toxics10020086>

Rubin, B., S. (2011). Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **127**: 27-34. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.05.002

Santoro, A., Chianese, R., Troisi, J., Richards, S., Nori, S., L., Fasano, S., Guida, M., Plunk, E., Viggiano, A., Pierantoni, R., Meccariello, R. (2019). Neuro-toxic and Reproductive Effects of BPA. *Current Neuropharmacology*. **17**: 1109-1132. DOI:10.2174/1570159X17666190726112101

Sarria, A., Gallo, J., Pérez, E. (2019). Bisphenol-A: A contaminant present in plastic containers. *Revista ITTPA*. **01**:35-41.

Seta, D., D., Minder, I., Dessí-Fulgheri, F., Farabollini, F. (2005). Bisphenol A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Research Bulletin*. **65**: 255-260. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.11.017

Shoei-Lung Li Steven., Singh Sher. (2012). Epigenetic Effects of environmental chemicals Bisphenol A and Phthalates. *International journal of molecular sciences*. **13**: 10143–10153. doi:10.3390/ijms130810143

Sonavane, M., Gassman, R, N. (2019) Bisphenol A co-exposure effects: a key factor in understanding BPA's complex mechanisms and health outcomes. *Critical Reviews in Toxicology*. 1-16. Doi: 10.1080/10408444.2019.1621263

Strakovsky, S., R., Schantz, L., S. (2018). Using experimental models to assess effects of bisphenol A (BPA) and phthalates on the placenta: Challenges and perspectives. *Toxicological Sciences*. **166**: 250-268. doi: 10.1093/toxsci/kfy224.

Subramanian, U. (2022). Validation of Animal Models. In: Lakshmanan, M., Shewade, D., G., Raj, G., M. (eds). Introduction to Basic of Pharmacology and Toxicology, vol 3. Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-5343-9>

Ugarte, A., R. (2006). "Conducta maternal y respuesta al estrés de ratas criadas por madres de alto y bajo bostezo". Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala. División de Ciencias Biológicas. Tlaxcala, Tlax.

Ugarte, A., Eguibar, J., R., Cortés, Ma. del C., León-Chávez, B., A., Melo, A., I. (2011). Comparative analysis of maternal care in the High-Yawning (HY) and Low-Yawning (LY) sublimes from Sprague-Dowley rats. *Developmental Psychobiology*. **53**: 105-117. DOI 10.1002/dev.20497

Urbá-Holmgren R., Santos, A., Holmgren, B., Eguibar, J., R. (1993). Two inbred rat sublimes that differ in spontaneous yawning behavior also differ in their responses to cholinergic and dopaminergic drugs. *Behavioural Brain Research*. **56**: 155-159. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90033-M](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90033-M)

Urbá-Holmgren, R., Trucios, N., Holmgren, B., Eguibar, J.R., Gavito, A., Cruz, G., Santos, A. (1990). Genotypic dependency of spontaneous yawning frequency in the rat. *Behavioural Brain Research*. **40**: 29-35. doi:10.1016/0166-4328(90)90039-h

Vandeberg, L., N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, V., W. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*. **24**: 139-177 doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010

Vendenberg, N, L., vom Saal, S, F. (2020). Update on the Health Effects of Bisphenol A: Overwhelming Evidence of Harm. *Endocrinology*. **3**:1-25. Doi:10.1210/endocr/bqaa171

Wang, X., Dong, Q., Chen, Y., Jiang, H., Xiao, Q., Wang, Y., Li, W., Bai, C., Huang, C., Yang, D. (2013). Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish. *Aquatic Toxicology*. **142-143**: 104-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.07.011>.

Wang, X., Lou, Z.-C., Du, O., Zhang, H.-J., Fan, P., Ma, R., Chen, Y., Wang, J., Ouyang, F. (2023). The association between maternal urinary Bisphenol A levels and neurodevelopment at age 2 years in Chinese boys and girls; A prospective

cohort study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **264**: 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115413>

Wang, T., Xu, F., Song, L., Wang, Q. (2021). Bisphenol A exposure prenatally delays bone development and bone mass accumulation in female rat offspring via the ER β /HDAC5/TGF β signaling pathway. *Toxicology*. **456**: 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152830>

Wu, D., Wu, F., Lin, R., Meng, Y., Wei, W., Sun, Q., Jia, L. (2020). Impairment of learning and memory induced by perinatal exposure to BPA is associated with ER α -mediated alterations of synaptic plasticity and PKC/ERK/CREB signaling pathway in offspring rats. *Brain Research Bulletin*. **161**:43-54.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.04.023>

Yu, ZX., Li, XY., Xu, XH. (2020). Neural Circuit Mechanisms That Underlie Parental Care. In: Wang, H. (eds) *Neural Circuits of Innate Behaviors*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1284. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-7086-5_6