

Efectos de la Benzo[a]pirina en el comportamiento y las monoaminas (5-HT y DA) en ratones Cyp1a2 (-/-) y tipo salvaje por exposición temprana en la descendencia durante la gestación y lactancia.

Benzo[a]pyrene effects on behavior and monoamines (5HT and DA) of Cyp1a2 (-/-) and wild type mice by early exposure offspring during pregnancy and lactation

Elda Melissa García Retama ^a

Abstract:

Benzo[a]pyrene (BaP) is a polycyclic aromatic hydrocarbon with toxic, carcinogenic, and teratogenic effects in humans and animals. Its exposure during gestation and lactation can alter the neuronal communication of motor cells and those related to learning in offspring. In this study, the effects of early exposure to BaP on behavior and the levels of monoamines, specifically dopamine (DA) and serotonin (5-HT), were evaluated in wild-type and Cyp1a2 (-/-) mice. BaP (10 mg/kg/day) was administered using cereal as a vehicle to pregnant mice from gestational day 10 until weaning on postnatal day 25. Reflex reorientation and negative geotaxis tests were conducted on neonates, and monoamine levels were analyzed using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. The results showed a significant delay in the development of the righting reflex in BaP-exposed pups, with no differences in the negative geotaxis test. These preliminary results suggest that early exposure to BaP may affect motor development and neurotransmission in key brain regions. Until the time of the experiment, behavioral tests had not been conducted in adults. However, additional tests will be performed in adulthood to assess the long-term impact of prenatal BaP exposure.

Keywords:

Benzo[a]pyrene, BaP, prenatal exposure, motor behavior, monoamines, neurotransmission.

Resumen:

La Benzo[a]pirina (BaP) es un hidrocarburo aromático policíclico con efectos tóxicos, carcinogénicos y teratogénicos en humanos y animales. Su exposición durante la gestación y lactancia puede alterar la comunicación neuronal de las células motoras y aquellas relacionadas con el aprendizaje en los descendientes. En este estudio, se evaluaron los efectos de la exposición temprana a BaP en el comportamiento y los niveles de monoaminas, específicamente dopamina (DA) y serotonina (5-HT), en ratones silvestres y Cyp1a2 (-/-). Se administró BaP (10 mg/kg/día) usando cereal como vehículo a ratonas preñadas desde el día gestacional 10 hasta el destete en el día postnatal 25. Se realizaron pruebas de reflejo de reorientación y geotaxia negativa en neonatos, y se analizaron los niveles de monoaminas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica. Los resultados mostraron un retraso significativo en el desarrollo del reflejo de enderezamiento en crías expuestas a BaP, sin diferencias en la prueba de geotaxia negativa. Estos resultados preliminares sugieren que la exposición temprana a BaP podría afectar el desarrollo motor y la neurotransmisión en regiones cerebrales clave. Hasta el momento del experimento, no se habían realizado pruebas conductuales en adultos. Sin embargo, se llevarán a cabo pruebas adicionales en la etapa adulta para evaluar el impacto a largo plazo de la exposición prenatal a BaP.

Palabras Clave:

Benzo[a]pirina, BaP, exposición prenatal, comportamiento motor, monoaminas, neurotransmisión.

^a Elda Melissa García Retama, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo | Escuela Preparatoria Número 3 | Pachuca de Soto-Hidalgo, México, <https://orcid.org/0000-0002-2203-862X>, Email: elda_garcia@uaeh.edu.mx

Introducción

La Benzo(a)pirina (BaP) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) reconocido por sus propiedades tóxicas y carcinogénicas^{1,2}, formado principalmente durante la combustión incompleta de materiales orgánicos como el carbón, el petróleo y el tabaco (Figura.1). Este contaminante ambiental ha generado preocupaciones significativas debido por ser recalcitrante en medios como suelo y agua, además de ser potencialmente carcinogénico y neurotóxico.

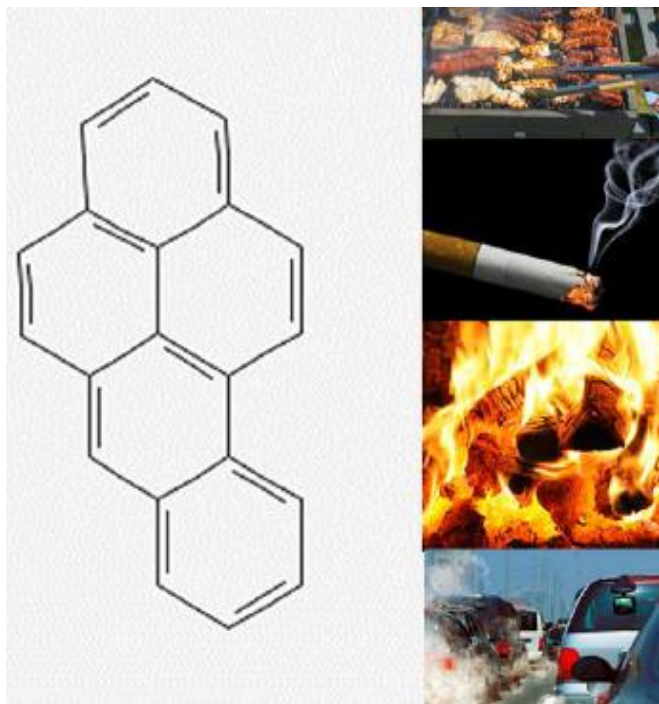


Figura 1: Molécula de BaP y fuentes de producción

Elaboración propia

Sin embargo más allá de los riesgos ambientales que puede ocasionar, el BaP ha cobrado relevancia en la salud por su implicación en anomalías neuroconductuales, particularmente a través de sus efectos sobre sistemas clave de neurotransmisores, como la serotonina (5-HT) y la dopamina (DA), que son esenciales para regular el estado de ánimo, el comportamiento y las funciones cognitivas^{3,4}.

En investigaciones con peces zebra⁵, se ha observado que la exposición a BaP puede alterar el equilibrio de serotonina y dopamina, lo que lleva a un incremento en la ansiedad, agresión y deterioro de las habilidades cognitivas. Los niveles bajos de serotonina se han asociado con un aumento de la impulsividad, mientras que la desregulación de la dopamina puede afectar negativamente el procesamiento de recompensas y la motivación, lo que resulta en problemas de

comportamiento como la adicción y los trastornos de ansiedad⁶. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar los efectos de la BaP no solo a nivel individual sino en la progenie y como es que la respuesta de neurotransmisores se ve afectada por la exposición al BaP^{8,9}. En ese sentido la exposición a la BaP durante el embarazo y la lactancia puede alterar la neurotransmisión en los descendientes como se ha demostrado en ratones⁹.

Cada año, ocurren aproximadamente 6 millones de embarazos en los Estados Unidos, pero solo la mitad resultan en el nacimiento de un bebé sano y a término (CDC 2020). Tanto los factores genéticos como los ambientales pueden contribuir a resultados adversos en el embarazo. En estudios previos, nuestro laboratorio identificó dos genes que aumentan la susceptibilidad al contaminante benzo[a]pireno (BaP), un compuesto representativo de una gran clase de contaminantes conocidos como hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos contaminantes se encuentran en los gases de escape de los vehículos, los alimentos a la parrilla, el humo de incendios forestales y el humo del tabaco, y están clasificados entre los diez principales contaminantes prioritarios en los Estados Unidos (ATSDR 2019).

Kentucky presenta una de las tasas más altas de tabaquismo en el país (CDC 2020). Además, el consumo de alimentos a la parrilla ha aumentado en un esfuerzo por reducir la ingesta de alimentos fritos con alto contenido de grasa. El humo de los incendios forestales en el oeste del país puede desplazarse a través de los Estados Unidos, y la mitad de la población en áreas urbanas está expuesta a altos niveles de contaminación del aire relacionada con el tráfico. En consecuencia, el riesgo para las mujeres embarazadas y sus bebés ha aumentado significativamente en los últimos años.

Investigaciones previas en peces, ratas y ratones han revelado alteraciones en los niveles de estas monoaminas como consecuencia de la exposición a BaP en diversas regiones cerebrales⁷⁻⁹. En este trabajo, se examinaron las diferencias en los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos, como la dopamina (DA) y la serotonina (5HT), debido a que la exposición de BaP puede comprometer la neuroplasticidad del cerebro, dificultando la capacidad de adaptarse y aprender nuevos comportamientos⁸. que están directamente involucrados en procesos como el movimiento y la memoria (Figura 2). En consecuencia este trabajo focalizó sus esfuerzos por analizar aquellas áreas del cerebro que son fundamentales para el aprendizaje, la memoria y el control motor (Figura 3).

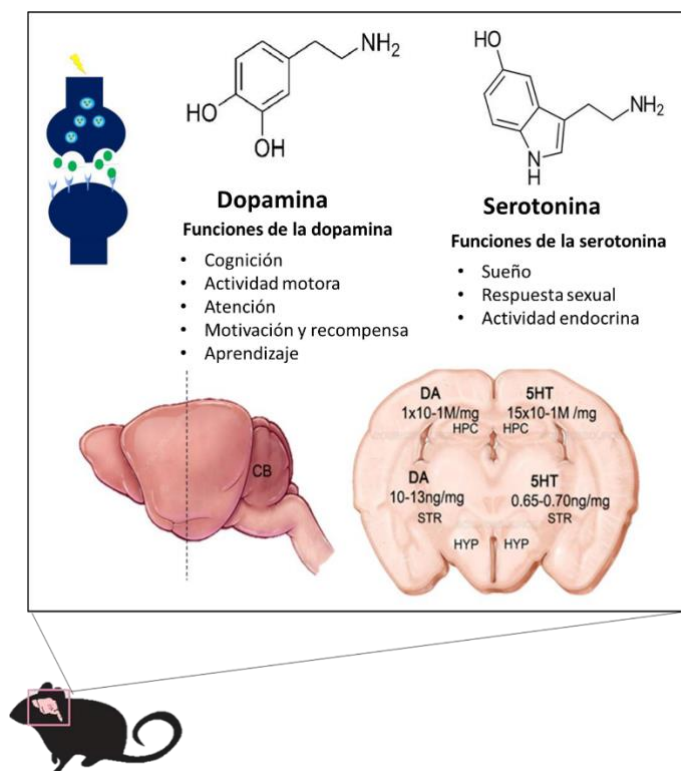


Figura 2 Estructura molecular y función de la dopamina y serotonina en el cerebro de un ratón.

Elaboración propia

hidrocarburos aromáticos (AHR) pueden influir en la susceptibilidad de un individuo a la exposición al BaP durante el desarrollo temprano del cerebro. El AHR es un factor de transcripción que regula las enzimas metabólicas CYP1A1 y CYP1A2, las cuales pueden metabolizar muchos contaminantes comunes, incluido el BaP (Figura 4). Tanto CYP1A1 como CYP1A2 se expresan ampliamente en el cerebro en desarrollo, aunque son más conocidos por su papel en el hígado¹⁰.

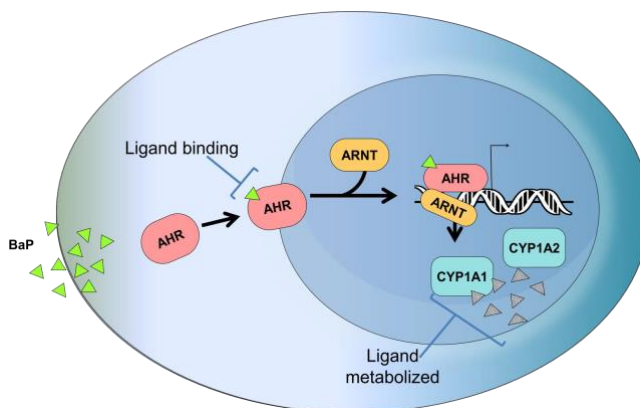


Figura 4 Transactivación de la vía AHR por benzo[a]pireno. En ratones, el alelo AHRb tiene alta afinidad por el BaP, mientras que el alelo AHRd tiene baja afinidad. Esto significa que CYP1A1 y CYP1A2 solo se regularán al alza en ratones AHRb-

Modificada de Khazaal et al. 2018

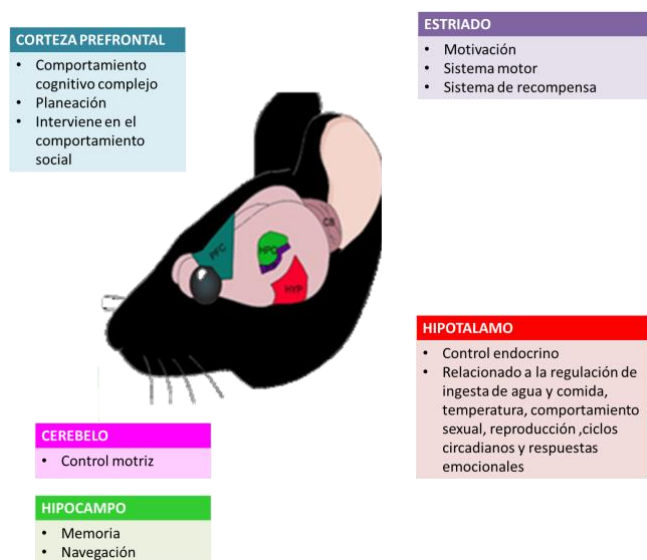


Figura 3 Regiones cerebrales de interés en este trabajo y sus funciones clave en el sistema nervioso

Elaboración propia

Métodos y materiales

Para realizar este estudio, se utilizaron ratones de la cepa Cyp1a2(-/-) donados por el Dr. Daniel W. Nebert, del Centro Médico de la Universidad de Cincinnati en Cincinnati, Ohio. Se emplearon como sujetos de estudio a ratonas grávidas, asignadas aleatoriamente a grupos de tratamiento. Estos grupos recibieron 10 mg/kg/día de benzo[a]pirina en cereal empapado en aceite de maíz o solo cereal con aceite de maíz como control. El tratamiento se mantuvo hasta el destete de las crías a los 25 días de edad (Figura 5).

Dado que la exposición prenatal a benzo[a]pirina puede afectar el desarrollo neuromotor, se realizaron dos pruebas conductuales para evaluar estos efectos: el reflejo de enderezamiento y la geotaxis negativa (Figura 5). La primera prueba consistió en evaluar la capacidad del neonato para corregir su posición y recuperar una postura normal después de haber sido colocado boca arriba. Este reflejo está asociado con el desarrollo neuromuscular y el equilibrio, por lo que una mayor latencia o un retraso en su aparición pueden indicar

Así mismo en este estudio se intentó determinar si las diferencias genéticas en la vía del receptor de

alteraciones en el desarrollo motor, problemas de equilibrio o déficits en la coordinación.

La prueba se llevó a cabo con cinco neonatos, colocándolos en posición supina (boca arriba) sobre una superficie plana, y se midió el tiempo necesario para que recuperaran la posición prono (sobre sus patas). Esta evaluación se realizó en los días postnatales 5, 7 y 10.

La prueba de geotaxis negativa se realizó con los mismos sujetos experimentales en los días postnatales 7, 10 y 14. Esta prueba evalúa la respuesta innata del neonato para orientarse contra la gravedad y desplazarse hacia una posición más estable. Para llevarla a cabo, cada animal fue colocado en una superficie inclinada a 45°, con la cabeza apuntando hacia abajo. Se midió el tiempo que tardó en girarse y moverse en dirección opuesta a la pendiente, es decir, hacia arriba. Esta prueba permite evaluar la función vestibular y la coordinación motora. Un retraso o la incapacidad para completar esta tarea pueden indicar alteraciones en el sistema motor o vestibular.



Figura 5 Las ratonas gravídes fueron administradas con 10 mg/kg/día de BaP o vehículo de alimento impregnado con aceite de maíz, desde el día gestacional 10 (G10) hasta el destete de las crías al día postnatal 25 (P25). La función motora y los reflejos fueron evaluados en múltiples momentos antes del destete. Posterior a este ensayo pruebas neuroconductuales adicionales en la descendencia adulta, tanto machos como hembras, serán realizadas en el día postnatal 60(P60).

Elaboración propia

Posteriormente, se realizó la cuantificación de monoaminas (Figura 6) utilizando una modificación del protocolo de Rao (1989) para la medición de dopamina en plasma y otras catecolaminas. Para este procedimiento, se obtuvo tejido encefálico de animales adultos mediante perfusión. El tejido fue almacenado a -80°C hasta su utilización. Se pesó el tejido y se procedió a su homogeneización añadiendo HClO₄ 0.1N. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rcf y se guardó el sobrenadante para su análisis mediante HPLC Empower 3, donde se procedió a la cuantificación de las monoaminas.



Figura 6 Se modificó los métodos publicados para cuantificar dopamina, serotonina y sus tres principales metabolitos (DOPAC, HVA y 5-HIAA) se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia con detección electroquímica.

Elaboración propia

Resultados

Cuantificación de monoaminas

En este trabajo preliminar estos compuestos pudieron ser separados y cuantificados en diferentes tejidos cerebrales (Figura 7A-C).

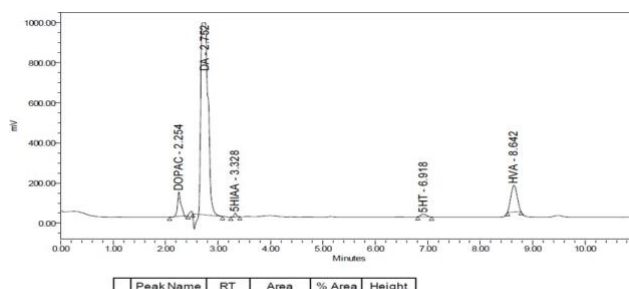
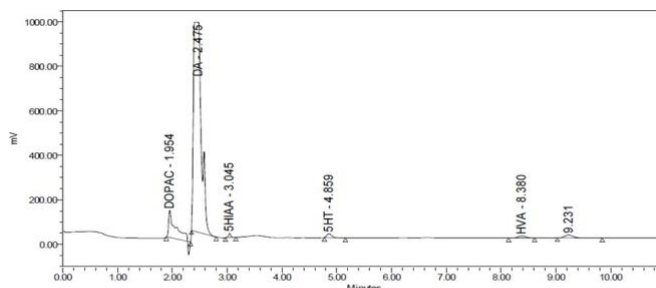


Figura 7A se observa los componentes aislados DOPAC, DA, 5HIAA, 5HT y HVA obtenidos del estriado. DA presentó un pico de 2.752 mV, DOPAC 2.254mV, HVA 8.642 mV, 5HT 6,918 mV y 5HIAA de 3.328mV



Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1 DOPAC	1.954	1211964	11.12	122655
2 DA	2.475	9287297	85.22	963060
3 5HIAA	3.045	53786	0.49	18845
4 5HT	4.859	106025	0.97	17535
5 HVA	8.380	90882	0.83	9223
	9.231	148081	1.36	13180

Figura 7B se observa los componentes aislados DOPAC, DA, 5HIAA, 5HT y HVA obtenidos del PAC

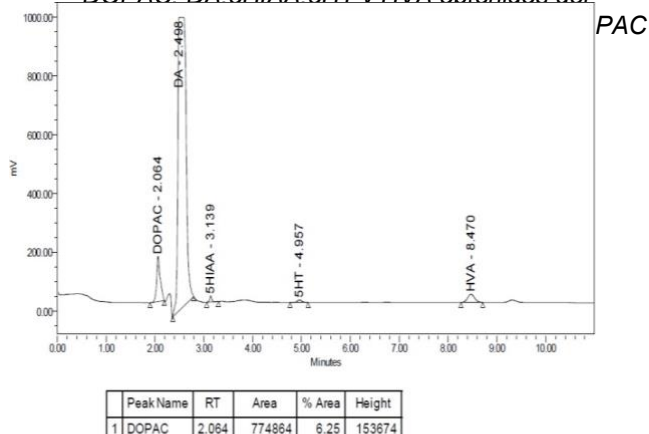


Figura 7C se observa los componentes aislados DOPAC, DA, 5HIAA, 5HT y HVA obtenidos del hipocampo. DA presentó un pico de 2.498 mV, DOPAC 2.064mV, HIVA 8.470 mV, 5HT 4,9957 mV y 5HIAA de 3.139mV

Pruebas neuromotoras

Se encontró un aumento significativo de la latencia en la prueba de reflejo de enderezamiento a los 7 días postnatales en los neonatos expuestos a BaP. No se observaron diferencias significativas en P5 ni en P10 (Figura 8). No hubo interacción entre el gen y el tratamiento. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los neonatos expuestos a BaP en la prueba de geotaxia negativa. Todos los animales mostraron un desarrollo normal de la función motora y los reflejos motores.

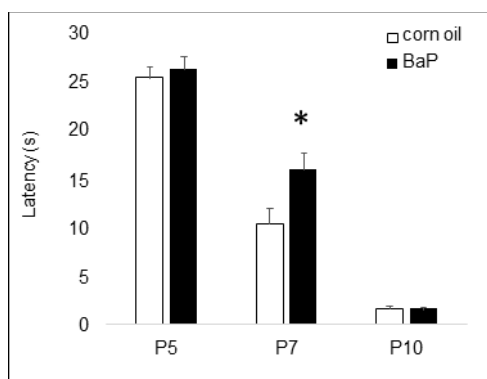


Figura 8: Resultados del reflejo de enderezamiento en ratones tratados con BaP y controles.

$P < 0.05$

No se encontraron diferencias significativas en los cachorros expuestos a BaP en la prueba de geotaxia

negativa. Todos los animales mostraron un desarrollo normal de la función motora y los reflejos motores (Figura 9).

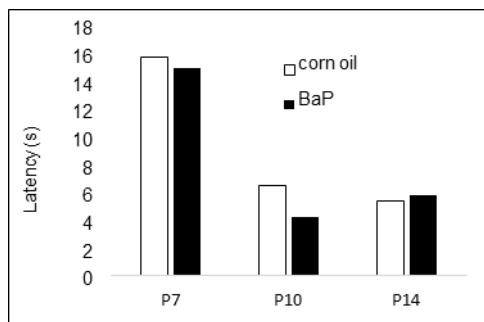


Figura 9: Resultados de geotaxia negativa en ratones tratados con BaP y controles.

$P > 0.05$

En conclusión, se logró modificar con éxito los métodos de HPLC previamente publicados, permitiendo la detección y cuantificación de dopamina, serotonina y sus metabolitos en tejido cerebral. Se observó un retraso significativo en el desarrollo del reflejo de enderezamiento en los ratones expuestos a BaP. No se encontraron diferencias significativas en la prueba de geotaxia negativa. Se realizarán más pruebas de comportamiento en ratones adultos.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado como parte de una estancia de investigación en la NKU durante el programa Verano STEM-IRSEP 2019, con el apoyo y colaboración del equipo de laboratorio de la Dra. Christine Curran y la propia Dra. Curran. Sin embargo el trabajo presentado fue realizado de forma independiente por el autor.

Referencias

- [1] Bukowska, B., & Sicińska, P. (2021). Influence of benzo (a) pyrene on different epigenetic processes. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13453.
- [2] Bukowska, B., Mokra, K., & Michałowicz, J. (2022). Benzo [a] pyrene—Environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6348.
- [3] Olasehinde, T. A., & Olaniran, A. O. (2022). Neurotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: a systematic mapping and review of neuropathological mechanisms. *Toxics*, 10(8), 417..
- [4] Zarmouh, N.O., Eyunni, S.K. & Soliman, K.F.A. The Benzopyrone Biochanin-A as a reversible, competitive, and selective monoamine oxidase B inhibitor. *BMC Complement Altern Med* 17, 34 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1525-y>
- [5] Gao, D., Wu, M., Wang, C., Wang, Y., & Zuo, Z. (2015). Chronic exposure to low benzo [a] pyrene level causes neurodegenerative

- disease-like syndromes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 167, 200-208.
- [6] Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2009). β -Naphthoflavone and benzo (a) pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(1), 191-198.
- [7] Liu, D., Zhao, Y., Qi, Y. et al. Benzo(a)pyrene exposure induced neuronal loss, plaque deposition, and cognitive decline in APP/PS1 mice. *J Neuroinflammation* 17, 258 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01925-y>
- [8] Sui, L., Nie, J., Xiao, P., Yan, K., Zhang, H., Liu, J., ... & Liang, X. (2020). Maternal benzo [a] pyrene exposure is correlated with the meiotic arrest and quality deterioration of offspring oocytes in mice. *Reproductive Toxicology*, 93, 10-18..
- [9] Beal, M. A., Meier, M. J., Williams, A., Rowan-Carroll, A., Gagné, R., Lindsay, S. J., ... & Yauk, C. L. (2019). Paternal exposure to benzo (a) pyrene induces genome-wide mutations in mouse offspring. *Communications Biology*, 2(1), 228.
- [10] Nebert, D. W., Shi, Z., Gálvez-Peralta, M., Uno, S., & Dragin, N. (2013). Oral benzo [a] pyrene: understanding pharmacokinetics, detoxication, and consequences—Cyp1 knockout mouse lines as a paradigm. *Molecular pharmacology*, 84(3), 304-313.